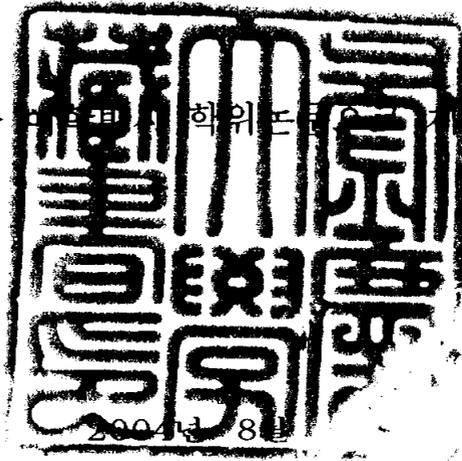


이학박사 학위논문

스쿠티카충, *Uronema marinum*의 숙주
감염 관련 인자들의 생화학적
특성 및 기능 분석

지도교수 정 준 기

이 논문을 제출함



부경대학교 대학원

어 병 학 과

서 정 수

서정수의 이학박사 학위논문을 인준함

2004년 6월 24일

주 심 이 학 박 사 이 형 호



부 심 이 학 박 사 김 기 홍



위 원 이 학 박 사 정 현 도



위 원 수 산 학 박 사 김 진 우



위 원 약 학 박 사 정 준 기



목 차

Abstracts	iii
List of Tables	vi
List of Figures	vii
서 언	1
제 1 장 스쿠티카충의 생체막 성분 분석 및 다양한 항원성 인자 검색	6
I. 서 론	6
II. 재료 및 방법	9
1. 스쿠티카충의 생체막 성분 분석	9
2. 스쿠티카충의 다양한 항원성 검색	11
III. 결 과	13
1. 스쿠티카충의 생체막 성분 분석	13
2. 스쿠티카충의 다양한 항원성 검색	18
IV. 고 찰	20
V. 요 약	23
제 2 장 스쿠티카충의 숙주 감염에 있어 PC 가수분해 효소의 기능	24
I. 서 론	24
II. 재료 및 방법	28
1. 스쿠티카충의 인지질가수분해 효소의 부분정제	28
2. 스쿠티카충의 PC 가수분해 효소의 특성	30
3. 숙주 감염시 PC 가수분해 기능	32
III. 결 과	34
1. 스쿠티카충의 인지질가수분해 효소의 부분정제	34
2. 스쿠티카충의 PC 가수분해 효소의 동정	35
3. 스쿠티카충의 mPC-PLD, mPC-PLC 및 cPC-PLC의 생화학적 특성	42

4. 숙주 감염시 PC 가수분해 효소의 기능	49
IV. 고찰	52
V. 요약	57
제 3 장 스쿠티카충의 단백질 분해효소의 특성 분석	59
I. 서론	59
II. 재료 및 방법	62
1. 스쿠티카충의 다양한 protease의 활성 특성 검색	62
2. 스쿠티카충의 cathepsin cysteine protease 유전자들의 클로닝, 발현 및 특성	64
3. 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease의 정제 및 기능 분석	77
III. 결과	79
1. 스쿠티카충의 다양한 protease의 활성 특성 검색	79
2. 스쿠티카충의 cathepsin cysteine protease 유전자들의 클로닝 서열 특성 분석 및 발현	81
3. 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease의 정제 및 기능 분석	94
IV. 고찰	102
V. 요약	105
종합 토의	107
총괄 요약	115
감사의 글	118
참고 문헌	119

Analysis of biochemical characteristics and functions of factors related to the host infection of scuticociliate, *Uronema marinum*

Jung Soo Seo

*Department of fish pathology, The Graduate School,
Pukyong National university*

Abstract

In Korea, Scuticociliatosis by *Uronema marinum* caused severely economic loss by the several problems such as mass mortalities in culturing olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. To investigate the mechanism of mass mortalities by the ciliate, the culture methods, morphological characteristics and enzymatic activities of the ciliates have been reported. Nevertheless, so far little is known how the ciliates enter into the host, and how it can be survived within the hosts. Therefore, the present study was carried out to analyze the biochemical characteristics and functions of factors related to the host infection of scuticociliate, *U. marinum*.

In the first chapter, lipid composition were analyzed to investigate the characteristics of host-parasite interaction through biological membrane. Phospholipids accounted for 70% of total lipid, and the remainder was neutral lipids in *U. marinum*. Phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), unidentified phospholipids (UP) were the major phospholipids, and phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), cardiolipin (CL) were minor phospholipids in *U. marinum*. Whereas, PC, PE, PI, PS were the major phospholipids, and CL & UP were the minor phospholipids in *P. olivaceus*. It was suggested that UP might be played a role in host-parasite interaction as ciliate

enter into host. In addition, the fatty acid composition in phospholipid comprised polyunsaturated fatty acid (52.7%), monounsaturated fatty acids (28.5%) and saturated fatty acids (25.5%), while the fatty acid composition in neutral lipid comprised monounsaturated fatty acids (49.2%), saturated fatty acids (30.1%) and polyunsaturated fatty acids (34.9%). Immunoblotting analysis showed that several antigen factors existed in *U. marinum* and the quantity of papain cysteine protease, which was a major factor, was changed corresponding to the condition of cultivation period.

In the second chapter, the existence and biochemical characteristics of PC-hydrolyzing enzymes in the scuticociliate, *U. marinum* were analyzed. Membrane bound PC-PLD (mPC-PLD) has the distinct characteristics from mammalian PLD. The activity of mPC-PLD was stimulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), but not small G-proteins Arf and GTP γ S. Through analyzing host-parasite attachment, this enzyme has no effect on attachment of ciliate but stimulated the formation of cyst of ciliate. Therefore, it was suggested that PC-PLD might be participated in the internal adaptation to environmental change but not in the host penetration of *U. marinum*. The mPC-PLC and cPC-PLC enzyme were obtained from membrane- and cytosol fraction of *U. marinum*, respectively. It is appeared that mPC-PLC has a maximal activity at optimum pH 6.0 and 0.4 mM of Ca²⁺, and cPC-PLC at optimum pH 7.0 and 1.6 mM of Ca²⁺. The cPC-PLC, not mPC-PLC, significantly decreased the chemiluminescence (CL) response and number of phagocytes, *P. olivaceus*. In addition, cPC-PLC also increased the host-parasite attachment, but didn't mPC-PLC. It was suggested that cPC-PLC act as a important factor in the invasion of ciliate into host.

In the third chapter, the cloning and biochemical characteristics of cathepsin cysteine protease in the scuticociliate, *U. marinum* were analyzed. Nucleotide

sequence of the cloned scuticociliate cathepsin B cysteine protease (ScCtB) encode a preproenzyme of 350 amino acid, comprising a 17 residue putative signal peptide, 68 residue propeptide and the 265 residue mature enzyme. The primary structure and enzymatic characterization support the conclusion that ScCtB belongs to the cathepsin B subfamily because of having 'GNFD' motif that highly conserved interspersed cathepsin B family. Nucleotide sequence of the cloned scuticociliate cathepsin L cysteine protease (ScCtL) encode a preproenzyme of 333 amino acid, comprising a 25 residue putative signal peptide, 93 residue propeptide and the 215 residue mature enzyme. The primary structure support the conclusion that ScCtL belongs to the cathepsin L subfamily because of having 'ERFNIN' motif that highly conserved interspersed cathepsin L family. A ScCtB enzyme (30 fraction) was obtained from DEAE-Sephadex HPLC column chromatography from scuticociliate extracts. This enzyme was a monomer with a molecular size of 29 kDa as estimated by SDS-PAGE, which was similar to the molecular size predicting from ScCtB cDNA structure. It is appeared that this enzyme showed a specific activity by cleaving a synthetic fluorogenic peptide substrate such as N-carbobenzyloxy-arginyl-arginyl-7-amino-4-methylcoumarin (ZRR-MCA). The protease caused the cytotoxicity in fish cell line (FFN) and hemolysis in flounder blood cells. It was suggested that ScCtB might be participated in immunoevasion and nutrition after host-infection of *U. marinum*.

Taken together with results, it could be suggested that multiple factors may be involved in host infection of scuticociliate, *U. marinum*. The PC-PLD might be participated in the internal adaptation to environmental change, and PC-PLC played a role in host infection and penetration, but cathepsin cysteine protease played a important in survival after host-infection of *U. marinum*.

List of Tables

Table 1.1. Comparison with relative phospholipid composition of <i>U. marinum</i> and flounder brain.	15
Table 1.2. Fatty acid composition of phospholipid from <i>U. marinum</i>	16
Table 1.3. Fatty acid composition of neutral lipid from <i>U. marinum</i>	17
Table 2.1. Distribution of choline releasing activity in subcellular fractions of scuticociliates, <i>U. marinum</i>	34
Table 2.2. Purification of phospholipases in <i>U. marinum</i>	38
Table 2.3. Inhibition peak A, B and C enzyme by various inhibitors.	41
Table 2.4. Effect of mPC-PLC, cPC-PLC, and D609 on cell attachment by <i>U. marinum</i>	51
Table 3.1. PCR primer sequences in this study.	68
Table 3.2. Design to construction of Cys_pro-For1 and Cys_pro-For2 primer.	71
Table 3.3. Specific primer to CR-based site-directed mutagenesis.	73
Table 3.4. Purification of the partial purified protein.	96
Table 3.5. Effects of various inhibitors on the enzyme activity of the partial purified ScCtB.	76

List of Figures

Fig. 1.1. HPLC chromatogram of phospholipids extracted from <i>U. marinum</i>	15
Fig. 1.2. Gas chromatography of standard sample profile.	16
Fig. 1.3. 10% SDS-PAGE (A) and Immunological analysis (B) of the extract from <i>U. marinum</i>	19
Fig. 1.4. 10% SDS-PAGE (A) and Immunological analysis (B) of the extract from <i>U. marinum</i>	19
Fig. 2.1. Chromatography of choline releasing activity through Heparin-5PW HPLC column.	37
Fig. 2.2. Chromatography of choline releasing activity through Heparin-5PW HPLC column.	37
Fig. 2.3. Reaction products formed in lipidic phase.	39
Fig. 2.4. Reaction products formed in aqueous phase.	40
Fig. 2.5. Effects of incubation time (A), pH (B), temperature (C), and Ca^{2+} & Mg^{2+} (D) on PLD activity.	45
Fig. 2.6. Effects of phospholipids on PLD activity.	46
Fig. 2.7. Effects of incubation time (A), pH (B), temperature (C), and Ca^{2+} & Mg^{2+} (D) on choline releasing activity.	47
Fig. 2.8. Effects of phospholipids on cmPC-PLC and cPC-PLC.	48
Fig. 2.9. Inhibition of zymosan-induced CL in olive flounder, <i>P. olivaceus</i> phagocytes by mPC-PLC and cPC-PLC of <i>U. marinum</i>	50
Fig. 2.10. Number of olive flounder phagocytes showing viability after chemiluminescence (CL) assay.	51
Fig. 3.1. Diagram showing the experiments of cathepsin B cysteine	

protease cloning isolated from scuticociliate, <i>U. marinum</i>	69
Fig. 3.2. Diagram showing the experiments of cathepsin L cysteine	
protease cloning isolated from scuticociliate, <i>U. marinum</i>	71
Fig. 3.3. Diagram showing of PCR-based site-directed mutagenesis.	73
Fig. 3.4. Effects of incubation time (A), pH (B), temperature (C) on	
proteolytic activities of scuticociliate extracts.	80
Fig. 3.5. The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of	
cathepsin B cysteine protease isolated from scuticociliate, <i>U. marinum</i>	84
Fig. 3.6. Comparison of the deduced amino acid sequence of ScCtB and	
other cathepsin B or cathepsin B-like protease.	87
Fig. 3.7. Expression, extractions and western blotting of recombinant	
cathepsin B partial protease.	88
Fig. 3.8. The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of	
cathepsin L cysteine protease isolated from scuticociliate, <i>U. marinum</i>	90
Fig. 3.9. Comparison of the deduced amino acid sequence of ScCtL and	
other cathepsin L or cathepsin L-like protease.	92
Fig. 3.10. Expression of recombinant cathepsin L cysteine protease.	93
Fig. 3.11. Chromatography of protease activity through a preparative	
DEAE-sephagel HPLC column.	96
Fig. 3.12. SDS-PAGE and Immunoblotting analysis of cathepsin B	
cysteine protease.	97
Fig. 3.13. Substrate gel (zymography) of the partial purified ScCtB.	98
Fig. 3.14. Determination of the optimum pH (A) and temperature (B)	
on flourogenic activity with ScCtB.	100
Fig. 3.15. Effects of ScCtB on hemolytic activity.	100
Fig. 3.16. Effects of cytotoxicity on fish cell line with ScCtB.	101

서 언

1994년 UN 해양법 협약의 발효로 각 나라는 본격적인 해양경쟁의 시대를 맞이하였으며, 각 나라마다 배타적 경제수역 설정에 따른 해외 어장의 상실과 연안 수산자원의 고갈 등으로 어선어업에 의한 생산증대는 기대하기 어려운 실정에 있다. 그러나, 우리나라는 국민 소득증가로 인해 소비자의 기호성이 높은 수산물의 소비는 지속적으로 증가되므로 양식 산업의 필요성은 더욱 중요시 되고 있다. 현재 우리나라에서는 10,000여개소의 양식장에서 연간 80만 톤의 고급수산물을 생산 공급하는 세계 7위의 양식 산업국이며, 이 중 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 1980년대 후반 인공종묘 생산기술 개발보급으로 해수어류 중 생산량이 가장 많은 34,533 MT 이 양식되고 있고 (해수부 통계년보, 2003), 연간 500억 이상을 수출하는 경제적으로 가장 중요한 어종이다. 그러나, 연안어장의 환경악화와 양적 생산성 증가 위주의 기술개발은 양식 어류의 항병력 저하를 가져와 양식어장에서 질병발생에 의한 피해를 매년 급증시켜 질병관리 문제가 양식 산업의 존립기반을 위협하는 주요 요소로 대두되고 있다. 최근 양식 넙치에 큰 피해를 주는 것으로 알려진 스쿠티카충 (Scuticociliatosis)은 섬모충에 의해서 발병하는 질병으로 넙치의 표피박리, 근육층이 노출되는 궤양증 및 종묘를 생산하는 종묘장에서 두부나 체표가 하얗게 변하면서 치어를 대량폐사 시킨다고 알려져 있다. 또한, 이 섬모충의 감염부위와 감염강도에 따라 체표 염증, 지느러미 연조, 꼬리자루 노출 및 두부손상 등이 특징적으로 나타나기도 하는 등 다양한 외부증상이 관찰되는 경우도 있다.

해양 어류에서 발병하는 스쿠티카충은 *Uronema*, *Miamiensis*, *Philasterides* 종으로 알려져 있으나 (Thompson and Moewus, 1964; Iglesias, et al., 2002), 우리나라 양식

넙치에 스쿠티카증을 일으키는 종은 Jee 등 (2001)에 의해 섬모충류의 하나인 스쿠티카목에 속하는 *Uronema marinum*으로 동정하였다. 이 기생충은 방추형 또는 오이씨 모양으로 성충의 크기는 30-45 μm , 자충의 크기는 18-25 μm 이며, 충체 중앙에 3 μm 크기의 핵을 가지고 있으며, 많은 수의 식포와 수축포를 가지고 있다 (Jee et al., 2001). 스쿠티카충의 번식은 단순한 2분열에 의한다고 알려져 있으며, 충체의 전신에 섬모를 지녀 활발한 운동을 하며 앞측면에 세포구를 가져 이것으로 숙주세포를 활발히 섭취한다고 보고되었다 (Thompson and Moewus, 1964; Iglesias, et al., 2002; Jee et al., 2001).

양식장에서 스쿠티카증에 걸린 넙치의 구제제로서는 대개 포르말린을 가장 많이 사용하고 있다. 그러나, 포르말린은 아가미나 체표에 기생한 스쿠티카충에 대해서만 구제 효과가 있으나, 뇌를 비롯한 내부기관에 침투한 스쿠티카충에는 효과가 없을 뿐만 아니라, 포르말린 사용으로 인한 소비자의 식품 안전성에 대한 불안감이 포르말린 사용을 제한하는 요인으로 대두되고 있다. 그러나 포르말린을 대체하기 위한 유용한 약제들이 *in vitro* 상에서 스쿠티카충에 대한 구제제로서 유효성을 스크리닝하고 있으나, 실제 어류를 대상으로 한 임상실험에서는 아직까지 스쿠티카충에 대한 효과적인 구제제는 거의 없는 실정이다 (Cribb et al., 1999; Iglesias, et al., 2002; Kwon et al., 2002). 따라서, 이러한 기존 약제의 협소성 및 효과의 미비성을 보완할 수 있는 스쿠티카충에 대한 효과적인 대체 약제의 개발은 아주 중요하다. 그러나, 현재 스쿠티카충의 감염, 부착 및 숙주 방어 등에 있어서 이 기생충의 다양한 감염 인자에 대한 연구의 부족으로 인해 스쿠티카증의 예방 및 치료에 어려움을 겪고 있다.

현재 스쿠티카충의 감염 경로를 밝히기 위한 다양한 인자들에 대한 연구가 진행되고 있으나, 아직까지 정확한 침입경로는 밝혀져 있지 않다. 스쿠티카충은 기회성 병

원 기생충 (facultative pathogen parasite)으로서 대개 환경요인의 변화가 성장, 분화 및 증식 등에 영향을 미친다고 알려져 있다 (Crosbie and Munday, 1999; Iglesias, et al., 2003). *Tetrahymena* 종의 경우는 온도 변화에 따라 막 인지질 (membrane phospholipid)의 acyl chain 성분을 변화시킴으로서 환경변화에 대하여 적응을 한다고 보고되고 있고 (Watanabe et al., 1981), 막 인지질은 다양한 외부의 변화에 대처하거나 숙주에 대한 침투 및 침입에 있어서 일차적인 역할을 하므로 스쿠티카충의 감염경로를 연구하는데 있어 중요한 대상으로 인식되고 있다. 또한, 이러한 막 인지질은 인지질가수분해효소 (phospholipase), protease, 당단백질, 탄수화물 등과 같은 물질과 복합적으로 이루어져 있어 기생충의 침투, 방어 및 대사 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Vial et al., 2003). 이 중 인지질가수분해효소는 많은 기생충 종에서 기생충의 숙주 침투 등에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Blum et al., 2001; Connelly and Kierszenbaum, 1985; Florin-Christensen et al., 1986; Ricard et al., 1999). *Trypanosoma cruzi* 및 *Toxoplasma gondii* 종에서 분리된 인지질가수분해효소 D (PLD)는 기생충과 숙주간의 부착 및 의사소통 (communication)에 관여한다고 알려져 있으며, 이는 PLD가 외부로 분비되어 숙주의 침입에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다 (Connelly and Kinerszenbaum, 1985; Saffer and Schwartzman, 1991). 섬모충류인 *Tetrahymena sp* 종에서 PLD는 기생충의 증식, 성장 및 분화 등에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며 (Kovacs et al., 1996, 1997; Rasmussen and Rasmussen, 1999; Wang et al., 2001), 포유류의 PLD 특성과 다른 낮은 세포빈도수에서 세포사멸 (cell death)을 지연시킨다고 보고되었다. 또한, *Leishmania donovani* 종에서 PLD는 외부의 삼투압변화와 같은 환경변화에 있어 강한 활성을 나타낸다고 보고되고 있다 (Blum et al., 2001). 또다른 인지질가수분해효소인 PC-PLC는 기생충류에서 절대성 세포내 원충류인 *T. gondii*를 가지고서 세포내 공격 및 증식에 대한 영향을 보았을시 PC-PLC의 inhibitor인 D609에 의해 세포내 증식 및 cyst formation에

영향을 준다고 보고하였다 (Ricard et al., 1999; 1999). 현재 넙치에 큰 피해를 주는 스킨카충에 대하여 이 효소들에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다. 따라서, phospholipase 관련 단백질의 동정 및 기능 규명은 스킨카충의 숙주 침투 및 감염 등에 중요한 점을 시사해주리라 사료된다.

넙치에 기생한 스킨카충이 숙주인 넙치의 방어 시스템내에서 어떻게 생존할 수 있는 지에 대한 연구는 별로 되어 있지 않으나, Kwon 등 (2002)에 의해 antioxidant enzyme이 기생충의 생존에 중요한 역할을 하리라 보고한 것이 있다. 또한, 스킨카충으로부터 얻은 분획물인 protease가 숙주의 방어체계에 영향을 미친다는 보고도 있다 (Kwon et al., 2002; 2003; Iglesias, et al., 2003). 이러한 효소들 중 protease는 많은 원충류성 기생충 (Protozoan parasite)에서 다양한 형태 및 특성이 보고되고 있으며, 이 효소의 분자량 및 서열 등이 함께 보고되고 있다. 이 효소들은 다양한 숙주 (host)와 기생충 (parasite)간의 pathogenesis 및 숙주 방어에 관여하거나, 기생충의 nutrition에 관련이 있다고 보고되고 있다 (McKerrow 1989; North et al., 1990). 현재 해양 섬모충류인 *Tetrahymena* 종 및 *Paramecium* 종에서 발견되는 cysteine protease 들은 세포내에서 phagolysosome을 형성함으로써 세포내 소화와 관련하거나 세포외 소화에도 관여한다고 보고하였다 (Banno et al., 1983; Volkel et al., 1996). 또한, 터봇, *Scophthalmus maximus*에서 스킨카 질병을 일으키는 종으로 알려진 *P. dicentrarchi* 추출물의 cysteine protease 활성이 feeding에 중요한 역할을 한다고 보고하였다 (Iglesias et al., 2003). 더불어, 다양한 기생충 cysteine protease 들이 숙주 방어에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Sajid and McKerrow, 2002). 이러한 cysteine protease들은 스킨카충의 숙주침입 및 방어등에 중요한 역할을 하리라 추정되어진다. 그러나, 현재까지 넙치에 발병하는 스킨카충이 숙주에 침투하여 숙주내의 방어 시스템내에서 어떤 방법으로 생존하는지에 대한 연구는 많이 알려져 있지

않기 때문에, 스킨카충의 cysteine protease에 대한 연구는 이 의문점에 대하여 약간의 해결점을 시사해주리라 생각된다.

따라서, 본 논문은 우리나라에서 주로 양식 넙치에 질병을 유발하는 스킨카충이 어떠한 특성을 가지고서 감염되는지를 밝히기 위하여 다양한 원인인자들 중 스킨카충의 인지질가수분해효소와 cysteine protease에 대한 분자생화학적 특성 및 기능을 조사하였다. 이를 위하여 본 연구의 제 1장에서는 스킨카충의 다양한 항원인자를 가진 세포막의 성분 분석 및 다양한 항원인자를 검색하고자 했다. 제 2장에서는 스킨카충이 숙주에 침입하였을시에 중요한 원인인자로 인식되어지는 인지질가수분해효소 관련 단백질을 분리 및 동정하여 그 생화학적 특성을 밝혀 스킨카충의 다양한 생리적 기능을 조사하였다. 제 3장에서는 스킨카충의 감염 및 숙주 방어(host defence)등에 중요한 역할을 할 것이라 예상 되는 cathepsin cysteine protease 관련 단백질을 분리, 동정, 클로닝 및 그 기능을 밝히고자 하였다.

제 1 장 스쿠티카충의 생체막 성분 분석 및 다양한 항원성 인자 검색

I. 서론

원충기생충은 막 구조 (membrane structure)로 둘러싸여져 있으며 이러한 막 구조는 숙주 (host)의 막과는 다른 지질 및 단백질성분으로 구성되어져 있다 (Sul and Erwin, 1997). 기생충 막은 숙주세포공격이나 숙주면역에 대한 방어 혹은 영양분 섭취등과 같은 기생충의 특이적인 과정을 위해 구조적으로 완전한 형태를 가지고 있다. 게다가, 세포내 기생충들은 그들의 숙주 막을 조절할 수 있으며 숙주 막과 기생충 막사이의 trafficking 같은 막 성분의 변화를 유발할 수 있다고 알려지고 있다 (Harnett and Harnett, 2001). 이 중 인지질 (phospholipid)은 주요한 막 성분이며, 이러한 성분은 숙주로부터 얻거나 혹은 합성하여 얻어진다고 알려져 있다 (Bordmann et al., 1998). 원충기생충의 지질성분 및 대사에 대한 많은 연구들은 기생충의 지질이 백신 target이나 혹은 약물로 이용될 수 있으므로 인하여, 현재의 원충기생충에 있어서의 주요 연구는 phosphatidylcholine (PC)와 PC biosynthesis에 대한 연구 및 인지질 중 phosphonolipid를 대상으로 많이 수행되고 있다 (Zidovetzki and Sherman, 1991; Florin-Christensen et al., 1986, 2000).

PC는 원핵 및 진핵 병원체의 주요성분으로 대개 carbohydrate와 연관된 성분으로서 광범위하게 인식되어진다. 다양한 해양 원충섬모충류에서도 세포막내의 인지질 성분인 PC와 phosphatidylethanolamine (PE)가 major 성분을 이루며, phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), cardiolipin (CL)등은 minor 인지질성분으로 이룬다고 알려져 있고, 외부환경의 변화에 대하여 이 지질이 중요한 역

할을 한다고 알려져 있다 (Berger et al., 1972; Jonaha and Erwin, 1971; Rhoads and Kaneshiro, 1979; Sul and Ewin, 1997). 또한, 인지질은 숙주로부터 방어, 생존 및 침투 등을 위해서 glycosylphosphatidylinositol-anchored (GPI) protein (phospholipase), lipophosphoglycan 및 glycoinositolphospholipid로 이루어진 'glycocalyx'라 불리는 표면막을 가지고 있다. 첫 번째, GPI-anchored 분자 (phospholipase)들은 많은 원충기생충들에서 보고되고 있으며 (Ellis et al., 2002; Heise et al., 1996; Paquette et al., 2001), 이들은 숙주세포와 기생충의 상호작용에 관여하거나, 기생충의 life cycle에 관여하는 것으로 해양섬모충류에서는 GPI-protein 인 phospholipase들이 *Tetrahymena*와 *Paramecium tetraurelia* 등에서 보고되고 있다 (Paquette et al., 2001; Rasmussen and Rasmussen, 1999). 두 번째, lipophosphoglycan는 대개 당질화된 분자로서 잘 표현되는데 이는 주로 대부분의 원충류에서 lectin 혹은 lectin과 같은 구조의 당질화된 분자인 탄수화물을 말하며, 이들은 기생충의 숙주에 대한 부착, 침입에 있어서 중요한 매개체로 작용한다고 알려지고 있다 (Xu et al., 2001). 이 중 탄수화물은 *Cryptobia* spp. (Feng and Woo, 1998), *Entamoeba invadens* (Riberiro et al., 1997), *Glugea pleglossi* (Kim et al., 1999), *Leishmania* spp. (Grogil et al., 1987), *Trichomonas vaginalis* (Mirhaghani and Warton, 1998)등의 종에서 많이 보고되며, 숙주세포 표면의 인식 및 부착에 관여하거나 숙주와 기생충간의 상호작용에 관여한다고 보고된다. 마지막으로 glycoinositolphospholipid는 기생충막 성분의 일부분이며, 인지질의 구조의 한 성분으로 다양한 기능을 가진다고 보고되고 있다.

스쿠티카충의 인지질은 스쿠티카충이 넙치에 감염시 기생충의 침투, 증식 및 분화와 밀접한 상호관계를 가지고 있는 중요한 성분이다. 또한, 다양한 항원인자와의 상호작용에 따른 기생충과 숙주간의 상호작용에도 중요하게 작용한다. 그러므로, 본 장에서는 넙치에 기생하는 스쿠티카충의 생체막성분의 성분을 알아보고자 하였으며 더

불어, 생체막내의 다양한 항원인자를 검색하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 스쿠티카충의 생체막 성분 분석

1.1. 다양한 배지하에서의 스쿠티카충의 배양

스쿠티카충, *U. marinum*의 분리는 먼저 감염된 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 clean bench 안에서 해부를 한 후, 뇌를 꺼내어 1 × Hank's buffer saline (HBSS)에 넣은 후, 30분 동안 실온에 두었다. 그런 다음 1 × HBSS를 멸균 피펫으로 E-tube에 담아 1,000 × g, 3분 동안 원심분리하였다. 상층액을 미리 배양해둔 CHSE-214 주화세포 (10% FBS, 100 U streptomycin & penicillin G)에 접종하여 배양기에서 18°C, 5일간 배양하거나, 혹은 yeast 배지 (2% yeast, 34% NaCl), MEM 배지등에서 실온에서 3일간 배양하였다. 배양된 스쿠티카충은 1 × HBSS를 이용하여 1000 × g, 3분 동안 3번 세척한 후, 실험에 사용하기 전까지 -75°C에 보관하였다.

1.2. 스쿠티카충의 인지질 (phospholipid) 및 중성지질 (neutrolipid)의 분리

생체막을 분리하기 위하여 Guan 등 (2001)의 방법을 사용하였다. 먼저 스쿠티카충 (10^7 /ml)에 0.15 M KCl을 첨가한 후, 초음파기로 30초 동안 3회 파쇄하였다. 이것을 60분 동안 40°C에서 chloroform/methanol/water (CMW, 1/1/0.3, v/v/v)에 녹여 stirrer에서 균질화 한 후, CMW의 농도가 3/2/1 (v/v/v)이 되도록 용액을 첨가하였다. 이것을 1000 × g, 10분 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고, 침전물은 다시 질소 개스를 이용하여 증발시킨 후, 2 ml chloroform을 넣은 후, 미리 chloroform으로 평형화시켜둔 silica sepak cartridge (Zorbax, co. U.S.A)에 주입하였다. 중성지질은 25 ml의 chloroform에 용출되어지며, 인지질은 25 ml methanol에 용출되어졌다. 각각의 샘플은 질소개스를 이용하여 증발시킨 후, -75°C에 보관하였다.

1.3. Phospholipid의 분석

Guan 등 (2001)의 방법을 사용하여 미리 buffer A [hexane/isopropanol (3/2)] 와 buffer B[5 mM ammonium sulfate (pH 6.0) 55.4 g을 무게 잰 후, buffer A와 섞어 1리터를 만든 용액]를 50: 50 (v: v)으로 평형화시킨 Zorbax Rx-sil (25 × 4.6 mm, 5 μm, Agilent U.S.A) column 및 Zorbax Rx-sil guard column에 주입하였다. 주입한 샘플은 HPLC (Hewlett packard, HP1100)로 분석하였으며, 분석파장은 205 nm이며, 칼럼온도는 28℃, 유속은 1.5 ml/min을 유지하였다. 분속조건은 step gradient로서 처음부터 23분 동안은 B용매가 50%에서 78%로 증가하였고, 4분 동안 78%가 유지되었으며, 다시 9분 동안 100%로 B용매가 증가하였다. 그런 다음 3분 동안 B 용매가 유지된 후, 11분 동안 B 용매가 50%로 감소되었다. 그런 다음 처음과 같은 50: 50으로 평형화시켰다. 샘플의 양은 20 μl (0.6 μmol lipid phospholipid)를 넣었다.

1.4. Total lipid phosphorus 측정

질소 개스에 의해 증발된 샘플은 70% perchloric acid을 0.3 ml을 첨가하여 용해한 후, 60분 동안 180℃에서 가열하였다. 이것을 차갑게 한 후, 각 샘플은 1.25% ammonium molybdate와 5% ascorbic acid를 각각 400 μl씩 넣은 후, 물을 넣어 1.8 ml이 되게 하였다. 이것을 5분 동안 끓는 물에서 끓인 후, 30분 동안 실온에 두어 797 nm에서 흡수율을 측정하였다.

1.5. Fatty acid의 분석

지방산 분석을 위하여 Morrison and Smith (1967)의 방법으로 실험하였다. 먼저 각각의 중성지질과 인지질은 먼저 질소 개스로 완전히 날린 후, 이것을 fatty acid methyl esters (FAME)의 형태로 전환시키기 위해 메탄올에 녹인 14% boron trifluoride를 1 ml 씩 넣은 후, 90℃, 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, 각 샘플은 얼

에 넣은 후, 차갑게 해둔 pentane을 4 ml과 5 M NaOH를 1 ml 넣었다. 이것을 다시 혼합한 후, 상온에 1분간 두어 pentane층을 분리하여 새 E-tube에 넣어 질소개스로 농축시켜 다음과 같은 방법으로 분석하였다. 각 종 지방산은 Gas Chromatography Mass spectrometry (GC Mass)를 이용하여 분석하였다. 사용한 칼럼은 융합된 silica capillary type로 DB-5 (30 mm X 0.25 mm I.d., df = 0.18 μ m)이며 stationary phase로 이용하였다. 이동상은 수소가스를 이용하였으며, 온도는 130-190 $^{\circ}$ C로 프로그램되어져 있었고, 한 분석당 40분으로 분석을 하였다. 또한, 표준화된 샘플로서 33개의 각종 지방산을 먼저 표준화로서 보정하였다.

2. 스키테카충의 다양한 항원성 검색

2.1. 스키테카충에 대한 다클론 항체 (polyclonal antibody) 생산

스쿠테카충 (2×10^7 parasite/ml) 및 papain (Sigma. co. U.S.A from papaya latex)을 각각 500 μ l의 FCA와 혼합하여 병력이 없고 건강한 평균 체중 1.5 kg의 토끼 피하에 소량으로 최소 5군데 이상 주사하였으며, 3주 5주 7주 후 동량을 FIA와 혼합하여 동일한 방법으로 boosting하였다. Boosting 후 2주째에 심장에서 전혈하여 토끼 항혈청을 얻었으며, 이것을 rabbit anti scuticociliate polyclonal Ab 및 rabbit anti papain polyclonal Ab로 사용하였다.

2.2. SDS-PAGE & Western blotting

Lammili (1970)의 방법을 기초로 하여 separating gel 및 stacking gel의 조성은 각각 10%, 5% gel 로 만들었다. sample buffer는 5X sample buffer (60 mM Tris/pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptometanol, 0.1% bromophenol blue)을 사용하였으며, 샘플과 sample buffer는 4:1로 섞은 후, 100 $^{\circ}$ C, 5분 열을 가한 후, well에 주입하였다. SDS-PAGE로 전기영동시킨 band들은 western blotting을 위해

4°C에서 nitrocellulose membrane에 transfer (Hoefer 600)시킨 후, membrane을 세척 후, 1차 항체와 2차 항체에 각각 배양하였다. 얻어진 immune complex는 alkaline phosphatase (AP conjugate substrate, Bio-RAD. Co. U.S.A)로 발색시켰다.

III. 결 과

1. 스쿠티카충의 생체막 성분분석

스쿠티카충의 전체 지질 중 70% 가량은 인지질 (phospholipid)이며, 나머지는 중성 지질로 구성되어 있다. 이 중 스쿠티카충의 생체막 중 인지질의 성분을 분석하기 위해 상용으로 팔고 있는 HPLC용 phospholipid mixture (PC, PI, PE)를 이용하여 standard peak를 구하였다 (data not shown). 이것을 바탕으로 하여 추출한 스쿠티카충의 인지질 (0.7 μmol)을 hexane/isopropanol (3/2 v/v)로 평형화된 Zorbax Rx-Sil HPLC로 분석하였을시에 용출되는 순서는 PE, CL, PI, PS, PC로 나타났다 (Fig. 1.1). 스쿠티카충의 인지질의 상대적인 양은 24.26% PC, 22.20% PE, 10.54% PI, 8.11% PS, 6.17% CL과 28.72% unidentified phospholipid (UP)로 구성되어 있으며, major 인지질로는 PC, PE 및 UP가 있었으며, 이중 PC, PE가 대략 46% 정도 차지하였고, PI, PS, CL은 minor 인지질로 나타났다 (Table 1.1). 한편, 넙치 뇌를 위와 같은 방법으로 인지질을 분석하였을시에 각종 인지질의 양이 스쿠티카충의 인지질의 양보다 상대적으로 높게 나타났다 (Table 1.1).

스쿠티카충의 생체막 성분 중 인지질 및 중성지질의 지방산 분석은 GC-Mass를 이용하여 분석하였다. 이를 위해 먼저 각각의 인지질 및 중성지질은 메틸화시켰다. 메틸화된 샘플은 이전에 표준품으로 gas chromatography (GC) Mass spectrum으로 표준화시킨 결과와 비교 분석하였다 (Fig. 1.2). 인지질을 메틸화하여 GC-Mass로 분석하였을시에는 N-6 type의 지방산을 포함하는 다중불포화지방산 (linoleic acid, γ -linolenic acid)이 52.7%가량을 차지하며 나머지는 단일불포화지방산 (palmitoleic acid, oleic acid)이 28.5%와 포화지방산 (palmitic acid, stearic acid, myristic acid)이

나머지를 차지함을 알 수 있었다 (Table 1.2). 스쿠티카충으로부터 얻은 중성지질을 메틸화하여 GC-Mass로 분석하였을시에 단일불포화지방산 (oleic acid, myristoleic acid, palmitoleic acid, cis-10-heptadecenoic acid, 11-Icosenoic acid, nervonic acid)이 전체의 49.2% 정도를 차지함을 알 수 있었으며, 그 다음으로 포화지방산 (palmitic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid, pentadecanoic acid, margaric acid, stearic acid, arachic acid)이 30.1%정도 차지하고 나머지는 다중불포화지방산 (linoleic acid, cis-11,14-eicosadienoic acid, cis-8,11,14-eicosadienoic acid, γ -linolenic acid, α -linolenic acid, 5,8,11,14,17-Icosapentaenoic acid)이 차지함을 알 수 있었다 (Table 1.3). 이 중에서 특이하게도 다중불포화지방산내에 해수에 생존하는 원충기생충이면서도 다중불포화지방산내에 N-6 type의 지방산인 γ -linolenic acid와 N-3 type의 지방산인 α -linolenic acid, 5,8,11,14,17-Icosapentaenoic acid가 함께 존재한다는 사실을 알 수 있었다 (Table 1.3).

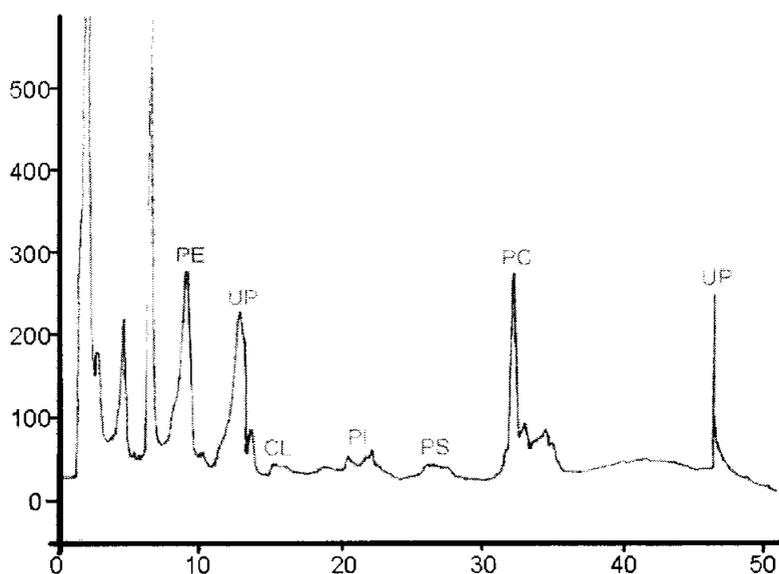


Fig. 1.1. HPLC chromatogram of phospholipids extracted from *U. marinum*. The samples (0.4 μ mol of lipid phosphorus) were injected into a Zorbax Rx-SiL column. The standard phospholipid mixture was used the mixture of cardiolipin, phosphatidylserine and soybean (L- α phosphatidylcholine, L- α phosphatidylinositol, L- α phosphatidylethanolamine). CL: cardiolipin, PC: phosphatidylcholine, PE: phosphatidylethanolamine, PI: phosphatidylinositol, PS: phosphatidylserine, UP: unknown phospholipid.

Table 1.1. Comparison with relative phospholipid composition of *U. marinum* and flounder brain. Data are mean values from five independent samples.

Phospholipid class	<i>U. marinum</i>	Flounder brain
	Relative amount (%)	Relative amount (%)
Phosphatidylcholine	24.26	25.36
Phosphatidylethanolamine	22.20	28.34
Phosphatidylinositol	10.54	18.41
Phosphatidylserine	8.11	15.34
Cardiolipin	6.17	8.21
Unidentified phospholipid	28.72	4.34

Table 1.2. Fatty acid composition of phospholipid from *U. marinum*. Identity of fatty acids were based on retention times of the used standard fatty acids. Data are mean values from five independent samples.

Fatty acid	Relative amount wt. (%)	Classification
Myristic acid (14:0)	1.7	
Palmitic acid (16:0)	16.8	SFA
Stearic acid (18:0)	7.0	
Palmitoleic acid (16:1)	6.0	MUSFA
Oleic acid (18:1)	22.5	
Linoleic acid (18:2)	45.0	
γ -linolenic acid (18:3)	7.7	PUSFA

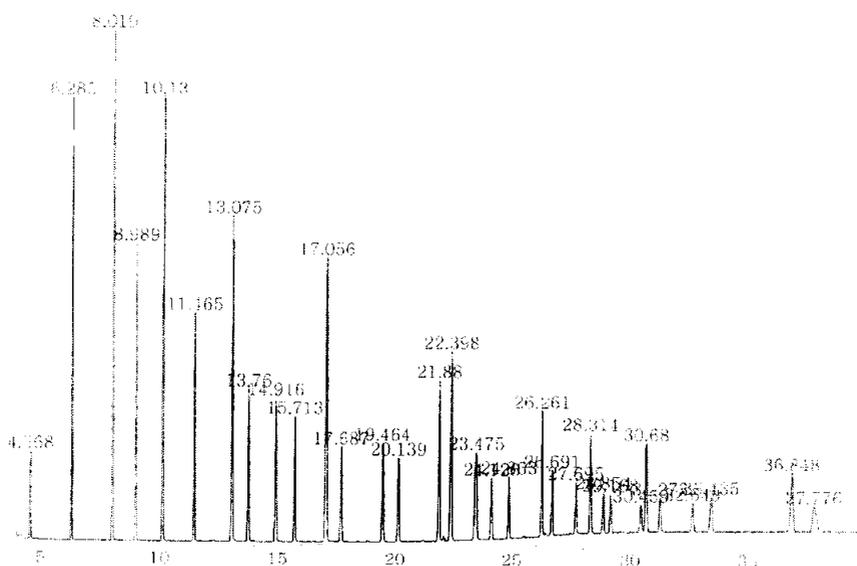


Fig. 1.2. Gas chromatography of standard sample profile. The standard sample were separated on a fused silica capillary column with DB-5 (30 mm X 0.25 mm I.d., $df = 0.18 \mu m$), as the stationary phase. Detection was performed with a flame ionization detector.

Table 1.3. Fatty acid composition of neutral lipid from *U. marinum*. Identity of fatty acids were based on retention times of the used standard fatty acids. Data are mean values from five independent samples.

Fatty acid	Relative Percentage (%)	Classification
Capric acid (10:0)	0.018	SFA
Lauric acid (12:0)	0.034	
Myristic acid (14:0)	0.437	
Pentadecanoic acid (15:0)	0.119	
Palmitic acid (16:0)	18.943	
Margaric acid (17:0)	0.285	
Stearic acid (18:0)	10.201	
Arachic acid (20:0)	0.058	
Myristoleic acid (14:1)	0.089	MUSFA
Palmitoleic acid (16:1)	0.376	
cis-10-Heptadecenoic acid (17:1)	0.169	
Oleic acid (18:1)	31.670	
11-Icosenoic acid (20:1)	0.319	
Nervonic acid (24:1)	16.550	PUSFA
Linoleic acid (18:2)	30.804	
cis-11,14-Eicosadienoic acid (20:2)	0.338	
cis-8,11,14-Eicosadienoic acid (20:3)	2.997	
α -Linolenic acid (18:3)	0.367	
5,8,11,14,17-Icosapentaenoic acid (20:5)	0.286	
γ -Linolenic acid (18:3)	0.098	

2. 스키테카충의 다양한 항원 검색

스쿠테카충의 다양한 항원성은 일정기간 *in vitro* 상의 배지에서 배양한 스키테카충과 산업적으로 파는 papain (Sigma)을 토끼에 근육 주사하여 얻은 항체를 이용하여 스키테카충의 *in vitro* 상의 배지에서 배양시에 다양한 항원의 변화를 면역분석에 의하여 분석하였다. 그림 1.3에서 보는 바와 같이 오랜 기간 배양함에 따라 다양한 항원 밴드가 사라지거나 혹은 다시 나타남을 알 수 있었다. 현재, *L. amazonensis* 와 *T. cruzi* 등의 기생충에서 papain 항체가 다양한 크기로 면역반응을 나타낸다고 알려져 있다 (Alves et al., 2000; Robertson et al., 1994). 따라서, 스키테카충의 추출물에 대하여 papain 항체는 면역반응을 통하여 100, 60, 39, 32 kDa등과 같은 다양한 형태의 papain like 단백질들이 검출되어짐을 알 수 있었다 (Fig. 1.4).

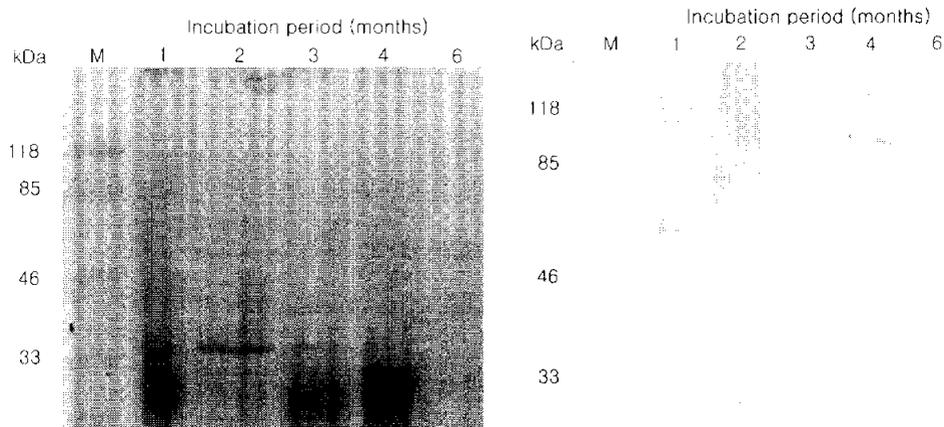


Fig. 1.3. 10% SDS-PAGE (A) and Immunological analysis (B) of the extract from *U. marinum*. Approximately 10 μg of scuticociliate-extract were solubilized in sample buffer, and 10% SDS-PAGE resolved proteins are transferred to nitrocellulose paper. Nitrocellulose-bound proteins were incubated with rabbit anti-scuticociliate serum (1:500) and the bound rabbit antibodies were revealed with BCIP/NBT.

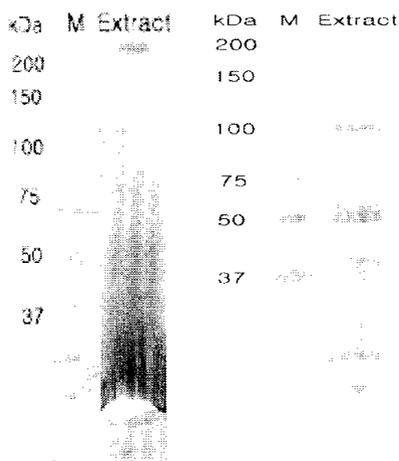


Fig. 1.4. 10% SDS-PAGE(A) and Immunological analysis(B) of the extract from *U. marinum*. Approximately 10 μg of scuticociliate-extract were solubilized in sample buffer, and 10% SDS-PAGE resolved proteins are transferred to nitrocellulose paper. Nitrocellulose-bound proteins were incubated with rabbit anti-papain serum(1:1,000) and the bound rabbit antibodies were revealed with BCIP/NBT.

IV. 고 찰

해양 섬모충인 *Parauremonema acutum*의 총 지질 중 인지질 성분은 75% 정도를 차지하며, 나머지는 중성지질로 이루어져 있다고 보고되며 특히, 인지질 중 PE, PC가 각각 33%, 24%를 차지하는 major 인지질이며, PI와 PS가 각각 11%, 7.8% 정도를 차지하고, SPL등이 주로 minor 인지질로 알려져 있다 (Sul and Erwin, 1997). 게다가 *Tetrahymena* sp. 와 *Paramecium* sp. 종에서도 마찬가지로 PE > PC > PI > PS순으로 구성되어 있다고 보고되었다 (Sul and Erwin, 1997; Kates and Volcani, 1966; Jonaha and Erwin, 1971; Berger et al., 1972; Rhoads and Kaneshiro, 1979). 본 실험에서 스쿠티카충에서 나타난 인지질의 성분은 다른 해양 *Tetrahymena* 나 *Paramecium* 과 같은 기생충등에서 나온 결과와 매우 유사한 것으로 나타났다. 즉, 인지질내의 성분 중 PC, PE는 주요한 성분이나 PI, PS, CL은 minor 성분으로 나타났으며, 스쿠티카충에서 CL의 존재를 제외하고 대개 섬모충류와의 인지질내의 성분의 상대적인 양은 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서, 스쿠티카충의 인지질의 성분은 전형적인 섬모충의 성분과 같음을 알 수 있었다. 더불어, 기생충은 다른 포유류 와 달리 특이하게 phosphonolipid라는 인지질을 가지는데 인지질내에서 약 60% 가량을 차지하며, 그 대부분이 PC로 이루어져 있다고 보고되고 있다 (Sul and Erwin, 1997; Kennedy and Thompson, 1970). 몇몇 논문들은 섬모충에서 phosphonolipid와 인지질가수분해 효소가 기생충의 침투 및 방어등에 중요한 역할을 수행한다고 보고하고 있다 (Florin-Christensen et al., 1986; Kennedy and Thompson, 1970). 따라서, 스쿠티카충 내에도 이 성분이 존재하리라 추정되며, 그 중 PC가 중요한 매개체로서 작용하지 않는가 사료된다.

다양한 해양섬모충들은 온도, 염분, pH 등과 같은 외부환경에 대하여 적응하는 능

력을 가지고 있다. 이러한 외부환경의 변화에 대하여 *Tetrahymena* 종 등은 온도적응을 위하여 PC와 PE가 중요한 역할을 한다고 보고하고 있으며 (Watanabe et al., 1980; Maruyama et al., 1982), PC내의 linolenic acid (18:2)의 양이 줄어들면서, ν -linolenic acid (18:3)의 양이 증가한다고 보고하고 있다. 더불어, 이러한 지질내 (PC & PE)의 고도불포화지방산 (HUSFA)의 영속성은 섬모 원충류의 낮은 온도에 대한 적응과 낮은 수심에서의 hydrostatic pressure를 증가시키는 생리적 적응에 관련이 있다고 보고되었다 (DeLong and Yayanos, 1985; Patton, 1975). 몇몇 논문들에서는 섬모 원충류는 명확히 제한된 분류상의 것으로 담수 섬모 원충류의 많은 종에서는 그들의 지방성분이 잘 설명되어져 있으며, 대개, 담수 섬모 원충류는 N-6 type의 다중불포화지방산 (PUSFA)인 ν -linolenic acid (18:3)와 arachidonic acid (20:4)를 가지나, 해양 생명체에서는 제한된 배지내에서 성장시에 N-3 type의 다중불포화지방산을 가진다고 보고하였다 (Erwin and Bloch, 1963; Rhoads and Kaneshiro, 1979; Sul and Erwin, 1997). 이번 결과에서 스쿠티카충의 중성지질내의 N-3 type [5,8,11,14,17-Icosapentaenoic acid (20:5), α -linolenic acid (18:3)]의 지방산이 존재하는 것으로 보아서, 스쿠티카충은 다른 해양 원충류에서 나타나는 전형적인 지질성분을 가지고 있음을 알 수 있었다. 그러나, 담수 섬모충에서만 검출되는 것으로 알려진 N-6 type의 ν -linoleic acid (18:3)가 중성지질과 인지질내에서 검출되는 것으로 보아 기존의 해양 섬모 원충류와는 다른 특이한 형태의 구조가 아닌가 추정되어졌다. 대개 기생충에서 N-3 type의 지방산은 현재 담수와 해수종의 섬모 기생충을 구별하는 기준이 되는 지방산으로 알려져 있으며, 이러한 지방산들은 기생충이 외부의 환경 요인들에 대한 생리적 적응력 (physiological adaptation)등에 밀접한 연관성을 가진다고 알려져 있다 (Kates and Volcani, 1966; Parrish et al., 1991; Sul and Erwin, 1997). 그런데, 스쿠티카충에서 이와 같은 N-3 type의 다중불포화지방산이 함께 발견된다는 사실은 아마도 스쿠티카충의 다양한 생리적 기능에 이 지방산들이 관여할 것

이라 사료되며 특히, 스키테카충의 침입, 침투 등에 중요한 성분으로 작용하지 않는
가 추정된다.

현재 기생충의 항원인자로 많은 효소가 관여한다고 알려져 있는데 특히, *T. cruzi*
에서는 G-protein 류 단백질, 인지질가수분해효소류, protease 류 등이 관여한다고 보
고되고 있다 (Wilkowsky, 2002). 어류 기생충에서 Cryptobiasis을 유발시키는
Cryptobia 종에서는 대개 protease 및 glycosome이 중요한 역할을 수행한다고 보고되
고 있으며 (Ardelli et al., 2000; Zuo and Woo, 1997, 1998), 채널메기의 백점충의 침
투에 있어서는 lectin의 성분이 중요한 역할을 수행한다고 보고되기도 한다 (Xu et
al., 2001). 또한, *P. tetraurellia*은 GPI-anchored protein이 중요한 역할을 수행하며, 섬
모충의 다양한 항원인자들은 *in vitro* 배양동안 항원인자가 달라진다고 보고하였다
(Paquette et al., 2001). 막 인지질은 인지질가수분해효소, protease, 당단백질, 탄수화
물 등과 같은 물질과 복합적으로 이루어져 있어 기생충의 침투, 방어 및 대사 등에
중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 (Vial et al., 2003), 본 장의 스키테카충도 이와
같은 형태로 이루어져 있음을 알 수 있었다. 이 중에서 다양한 기생충에서 분리되는
항원인자들 중 papain cysteine protease가 *L. amazonensis*와 *T. cruzi* 등에서는 기생
충의 life cycle 동안에 이 효소에 대한 교차반응이 다양하게 변화한다고 보고되었다
(Alves et al., 2000; Robertson et al., 1994). 그러므로, 스키테카충의 추출물내에서도
papain cysteine protease에 대한 면역 반응을 통하여 스키테카충도 다양한 기생충과
마찬가지로 papain cysteine protease가 중요한 역할을 할 것으로 사료되었다. 또한,
이러한 효소들이 *in vitro* 배양기간 동안 항원인자들이 사라지거나 감소하는 것은 스
키테카충의 숙주 감염시에 이 효소들이 중요한 역할을 하지 않는가 추정되었다.

V. 요약

본 장에서는 스쿠티카충의 생체막성분 및 다양한 항원성을 조사하였다.

1. 스쿠티카충의 전체 지질 중 70% 가량은 인지질이며, 나머지는 중성지질로 구성되어 있다. 스쿠티카충의 인지질의 상대적인 양은 24.26% PC, 22.20% PE, 10.54% PI, 8.11% PS, 6.17% CL과 28.72% unidentified phospholipid (UP)로 구성되어 있으며, PC, PE 및 UP는 major 인지질이나, PI, PS, CL은 minor 인지질로 나타났다. 스쿠티카충의 인지질 및 중성지질내의 지방산 분석은 GC-Mass를 이용하여 각각의 인지질 및 중성지질은 메틸화시켜 분석하였다. 인지질을 메틸화하여 GC-Mass로 분석 하였을시에는 다중불포화지방산 (linoleic acid, ν -linolenic acid)이 52.7%가량을 차지하며 나머지는 단일불포화지방산 (palmitoleic acid, oleic acid)이 28.5%와 포화지방산 (palmitic acid, stearic acid, myristic acid)이 나머지를 차지함을 알 수 있었다. 중성지질을 메틸화하여 GC-Mass로 분석하였을시에 단일불포화지방산 (oleic acid 외 5 종)이 전체의 49.173% 정도를 차지함을 알 수 있었으며, 그 다음으로 포화지방산 (palmitic acid외 7 종)이 30.095%정도 차지하고 나머지는 다중불포화지방산 (linoleic acid외 5종)이 차지함을 알 수 있었다.

2. 스쿠티카충의 다양한 항원성은 스쿠티카충 및 papain에 대한 토끼로부터 항체를 제작하여, 스쿠티카충의 *in vitro* 배양시에 면역분석에 의하여 다양한 항원의 변화를 western blotting으로 측정하였다. 면역 반응 분석을 통하여 다양한 band가 오랜 동안의 *in vitro* 배양시 다양한 항원 밴드가 사라지거나 줄어들음을 알 수 있었다. 또한, papain cysteine protease의 항체를 이용하여 스쿠티카충에 대한 면역반응시 많은 수의 항원 밴드가 존재함을 알 수 있었다.

제 2 장 스쿠티카충의 숙주 감염에 있어 PC 가수분해효소의 기능

I. 서 론

인지질은 세포막을 구성하는 중요한 기본 요소로 세포내의 여러 가지 대사과정을 통하여 세포내의 복잡한 반응을 유기적으로 통합하며, 생체에너지의 보존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있고 특히, 세포와 세포사이의 중요한 정보전달에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세포에서 생체막을 구성하는 인지질은 PC, PS, PE, PI 등이 있는 것으로 알려져 있으며, 이 중 PC는 원생 및 진핵성 병원성 생물에서 가장 중요한 성분으로 알려져 있다 (Harnett and Harnett, 1999). 이러한 각각의 인지질은 생체내에서 특이적으로 존재하는 가수분해효소에 의해 가수분해되어 여러 가지 생체 대사산물로 전환되고, 특이적인 인지질 가수분해효소 (phospholipase)는 주요한 lipolytic 효소로서 인지질의 ester나 phosphodiester bond를 가수분해하는 종류를 일컫는다. 인지질 가수분해효소들은 막 지질의 생합성 및 분해를 포함한 세포내 대사과정에 중요한 역할을 수행하며, 더불어 가수분해에 의해 생성된 2차 대사산물 (second messenger)은 생체신호전달 과정에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Rebecchi and Pentylala, 2000; Cockroft et al., 1994). PC는 주로 두 종류의 가수분해효소에 의하여 조절되어진다고 알려져 있으며 (Besterman et al., 1985; Price et al., 1989), 이것은 PC-PLD (phosphatidylcholine hydrolyzing phospholipase D)와 PC-PLC (phosphatidylcholine hydrolyzing phospholipase C)로 명명되어지고 있다. PC-PLD는 PC를 가수분해하여 대사산물로 phosphatic acid (PA)와 choline을 생성하며, 생성된 PA는 diacylglycerol (DAG)나 lysophosphatidic acid로 변환하여 섬유아

세포에서 mitogenesis의 promotion, neutrophils에서 respiratory burst의 자극, specific protein kinase 및 인지질의 대사조절 단백질의 활성화와 actin polymerization에 대한 영향 등 세포내 다양한 생리적 기능에 관여한다고 알려져 있다 (Exton, 1997, 2002; Knauss et al., 1990; Olson and Lambeth, 1996). PC-PLC는 PC의 phosphodiester bond를 가수분해하여 대사산물로 DAG와 phosphocholine이라는 두개의 이차전달물질 (second messenger)을 만든다고 알려져 있다 (Rebecchi and Pentylala, 2000). 이 중 DAG는 세포내의 PKC (Protein kinase C)라는 단백질을 활성화시켜 세포내의 다양한 대사, 성장 및 분화에 관련한다고 알려져 있다 (Wakelam, 1998; Han et al., 1999).

현재 기생충에서의 PC 가수분해 효소에 대한 연구는 다양하게 연구되어져 오고 있다. *Trypanosoma cruzi* 및 *Toxoplasma gondii* 종에서 분리된 인지질가수분해효소 D (PLD)는 기생충과 숙주간의 부착 및 communication에 관여한다고 알려져 있으며, 이러한 것은 PLD가 외부로 분비되어 숙주의 침입에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 암시해준다 (Connelly and Kinerszenbaum, 1985; Saffer and Schwartzman, 1991). 섬모 원충류인 *Tetrahymena* 종의 배양에서 early lag phase에서 PLC와 PLD가 생존 (survival), 죽음 (death) 및 분화 (differentiation)등에 관여하며, hormonal imprinting에도 관여한다고 보고하였으며, 포유류 PLD 특성과 다른 낮은 세포빈도수에서 세포사멸 (cell death)을 지연시킨다고 보고하였다 (Kovacs et al., 1996; Kovacs et al., 1997; Rasmussen and Rasmussen, 1999, 2000; Wang et al., 2001). 더불어, *Leishmania donovani* 종에서는 PC-PLD가 급성 (acute) osmotic stress에 대한 반응을 나타낸다고 보고되고 있으며, 분자생화학적 접근으로 *L. donovani*에는 human PC-specific PLD의 type와 같은 두 종류의 PC-PLD가 존재한다고 보고하였다 (Blum et al., 2001). *Paramecium* 종에서는 PC-PLD와 유사한 형태의 protein phosphatase에

대한 특성 및 분포에 대하여 보고되고 있는데 이 단백질이 ciliary motility와 cellular cargo transport에서 dyneins의 조절에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (Grothe et al., 1998).

PC-PLC는 포유류 세포에서 현재 주로 연구가 잘 되는 효소로서 대개 세포내의 다양한 signal transduction에 관여하는 효소로 알려져 있으며 (Albi and Magni, 1999), 포유류 세포의 mitogenic signaling, 난 성숙, Fas-활성의 유발 및 식세포에서 Fc receptor의 유발에 의한 inducible nitric oxidase synthase (iNOS)를 위한 NF- κ B transcription factor로서 작용한다고 보고되고 있다 (Shin and Han, 2000; Han et al., 1999; Lennartz, 1999; Bestermann et al., 1985; Sands et al., 1994). 몇몇 논문에서 이러한 PC-PLC는 rat liver 내의 chromatin에 존재하므로써 DNA의 합성등에 관여한다고 보고되기도 한다 (Albi and Magni, 1999). 세균류에서는 다양한 종에서 PC-PLC가 동정되고, 그 특성이 밝혀져 있다 (Tiball, 1993; Jepson and Tibball, 2000). *Clostridia* 세균류에서의 PC-PLC는 hemolytic 활성과 혈소판 응집활성을 가진다고 보고되고 있거나 (Tiball et al., 1989; Preuss et al., 2001), *Bacillus cereus* 종에서는 hemolysis 활성 및 sphingomyelinase 활성을 가진다고 보고되고 있다 (Pomerantsev et al., 2003). 기생충류에서의 PC-PLC는 *Trypanosoma sp* 종에서 숙주에 대한 부착 및 침투 등에 관여한다고 보고 있으며, *T. gondii* 등에서는 PC-PLC가 숙주에 대한 부착, 세포내 증식 및 숙주세포의 TNF 수용체와 acidic sphingomyelinase 사이에 결합하여 TNF- α 를 활성화시킨다고 보고되고 있다 (Ricard et al., 1999).

현재 기생충에 대한 치료제로서의 연구 등은 이러한 단백질에 대한 면역능력을 강화시키는 백신의 개발에 초점을 맞추고 있다. 앞 장에서 보였듯이 스키투카충의 세포막 인지질 중 PC는 중요한 성분일 거라고 추정되었다. 이는 스키투카충내의 PC를

구성하는 인지질이 내개 phospholipid로 구성되어 있으며, 이것과 인지질가수분해효소가 섬모충의 침투와 방어에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (Florin-Christensen et al., 1985, 1986). 따라서, 본 장에서는 스쿠티카충이 숙주인 넓치에 감염시에 phospholipase가 어떠한 기능을 할 것인지를 분석하고자 하였다. 이를 위해 스쿠티카충내의 PC 가수분해효소를 동정, 정제 및 생리적 기능을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 스쿠티카충의 인지질가수분해 효소의 부분정제

1.1. 스쿠티카충의 분리 및 배양

스쿠티카충의 분리는 먼저 감염된 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 clean bench 안에서 해부를 한 후, 뇌를 꺼내어 1 × Hank's Buffer saline (HBSS)에 넣은 후, 30분 동안 실온에 두었다. 그런 다음 1 × HBSS를 멸균 파켓으로 E-tube에 담아 1,000 × g, 3분 동안 원심분리하였다. 상층액을 미리 배양해둔 CHSE-214 주화세포 (10% FBS, 100 U streptomycin & penicillin G)에 접종하여 배양기에서 18°C, 5일간 배양하거나 혹은 0.1% yeast extract 배지를 이용하여 실온에서 배양하였다. 배양된 스쿠티카충은 1 × HBSS를 이용하여 1,000 × g, 3분 동안 3번 세척한 후, 실험에 사용하기 전까지 -75°C에 보관하였다.

1.2. 인지질 가수분해효소 추출

인지질가수분해효소를 분리하기 위하여 -75°C에 보관된 스쿠티카충 ($10^7/\text{ml} \times 20$)을 먼저 20 mM Tris/pH7.5, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF (homogenizing buffer)을 첨가한 후, 초음파기 (Branson, USA)로 4°C에서 30초 동안 40%, 3번 파쇄시켰다. 이것을 4°C, 1,000 × g에서 20분 동안 원심분리한 후, 상층액을 다시 4°C, 100,000 × g에서 1 시간동안 초원심분리하였다. 초원심분리한 것의 상층액 (cytosol extract)은 아래와 같은 정제 과정을 수행하였고, 침전물 (pellet)은 다시 1% triton X-100을 포함하는 균질 용액 (homogenizing buffer)을 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 교반하여 용출시켜 4°C, 100,000 × g에서 1시간 동안 초원심분리하여 그 상층액을 막 추출물 (membrane extract)로 사용하였다.

1.3. 부분 정제과정

먼저 0.45 μm syringe filter를 사용하여 여과한 막 및 세포질 추출물은 각각 HPLC (Hewlett Packard, HP1100)을 사용하여 정제하였다. 막 추출물은 먼저 Buffer A [20 mM Hepes/pH7.5, 1 mM EGTA, 0.1% triton X-100]로 평형화시킨 affinity heparin-5PW 칼럼 (7.5 cm \times 7.5 mm)에 주입한 후, 칼럼을 용액으로 세척하고 결합된 단백질은 염 농도가 0- 1 M 되게 linear gradient로 1 ml/min 속도로 용출하였다. 세포질 추출물은 막 추출물과 같은 방법으로 사용하였으나 buffer A에 triton X-100을 제외하여 분리하였다.

1.4. 인지질가수분해효소의 활성측정

PC가수분해효소의 활성측정은 인지질 중 PC를 분해하는 능력을 choline releasing assay를 사용하여 결정하였다. choline releasing 활성의 PC 가수분해 능력은 16 : 1.4 : 1 의 molar 비율의 PE, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂), PC에 분석 당 200,000 cpm을 나타내도록 [choline-methyl -³H(pam)₂PC]첨가된 인공막 (phospholipid vesicle)을 기질로 사용하여 다음과 같이 측정한다. 기질 25 μl 를 샘플 (6 μl) 및 50 mM Hepes/pH 7.5, 3 mM EGTA, 80 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂을 함유한 혼합액 125 μl 에 첨가한 후 37°C에서 1시간 배양한 후 stop solution A (CHCl₃, CH₃OH, conc HCl = 50 : 50 : 0.3, v/v) 1 ml과 stop solution B (1 M HCl in 5 mM EGTA) 0.35 ml을 넣어 반응을 종결시킨다. 반응액을 원심분리한 후 수용층액을 0.5 ml 취하여 cocktail solution 5 ml와 섞은 후, 이 속에 함유된 [³H] choline을 액체 방사선 동위원소 측정기 (PacKard co. U.S.A)로 측정하였다.

2. 스쿠티카충의 PC 가수분해 효소의 특성

2.1. Thin layer chromatography (TLC)

부분 정제된 PC 가수분해효소가 PC-PLC 인지 PC-PLD 인지를 확인하기 위하여 Chung 등 (1997)의 방법에 따라 16 : 14 : 1의 molar 비율의 PE, PI(4,5)P₂ 및 PC에 분석당 20,000 cpm을 나타나도록 [*palmitoyl*-³H]PC 또는 [*choline-methyl*-³H(pam)₂]PC를 첨가한 인지질 인공막을 기질로 사용하였다. 반응은 기질 25 μ l에 부분 정제된 효소 활성물질 (6 μ l)을 포함하는 50 mM HEPES/pH 7.5, 3 mM EGTA, 80 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂을 함유한 혼합액 125 μ l에 첨가한 후 37°C에서 2시간 배양하고 choline releasing assay에서 사용한 반응액에 stop solution A 1 ml과 stop solution B 0.35 ml을 넣고 반응을 종결시켰다. 반응액을 원심분리한 후 pellet과 상층액의 지질을 추출하여 chloroform/methanol /acetic acid (75/35/5 v/v) 또는 methanol/0.5% NaCl /acetic acid (100/100/5 v/v/v)용액에 용해시켜 동 용매로 박층크로마토그래피 (TLC)상에 전개시켰다. 전개시킨 TLC plate는 hood 안에서 건조시킨 후, tritium enhance spray를 뿌렸다. 그런 후, TR plate (Fuji imaging plate)와 함께 cassette에 넣은 후, 4일 후에 생성된 ³H-labeled 생성물들을 Cyclone Storage Phosphor System (Packard, Co. U.S.A)에서 OptiQuant Image Analysis Software를 사용하여 ³H-Labeled 생성물의 위치를 확인하였다.

2.2. Choline releasing 활성의 특성 분석

본 실험을 수행하기 위하여 상기의 choline releasing 활성 검색 실험하에서 각각의 조건을 변화시키면서 실험을 수행하였다. 먼저, 배양시간은 각각 30, 60, 90, 120, 150 분 동안 항온기에서 배양하였을시에 choline releasing 활성에 있어서의 영향을 조사

하였으며, pH에 대한 영향은 각각 pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8 의 존재하에서 choline releasing 활성을 조사하였고, 배양온도에 대한 영향은 동일 조건하에서 각각 20, 25, 30, 37, 40℃ 하의 항온기에서 배양시에 choline releasing 활성의 변화를 측정하였다. 현재 대부분의 PC 가수분해효소는 choline releasing 활성을 나타내는데 있어 이가 이온인 마그네슘과 칼슘이온의 영향을 많이 받으므로 각각 choline releasing assay 조건하에서 Mg^{2+} (0, 0.38, 0.68, 1.25, 2.5, 5 mM) or Ca^{2+} (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mM)을 농도 하에서 choline releasing 활성을 측정하였다. choline releasing 활성을 나타내는 PC-PLD는 PC-specific 한 형태와 PI-specific 한 형태를 가지므로 기질 특이성을 조사하기 위하여 먼저 인공지질막 (phospholipid vesicle)을 만들 때 각각 PC (0, 0.85, 1.7, 3.4, 6.8 mM), PE (0, 6.7, 13.4, 26.8, 53.6, 107.2 mM), PIP_2 (0, 1.2, 2.4, 4.7, 9.4 mM)의 다양한 농도아래에서 choline releasing 활성을 측정하였다.

2.3. 각종 phospholipase 저해제하의 활성의 변화측정

스쿠티카충으로부터 PC-PLD 및 PLC의 choline releasing 활성에 있어 다양한 인지질가수분해효소 억제제의 존재하의 활성의 변화를 측정하기 위하여 우선, PI-PLC inhibitor인 U 73122, PC-PLC inhibitor인 D609, PC-PLD inhibitor로 알려진 neomycin 등의 존재하에서 choline releasing 활성의 변화를 측정하였다.

2.4. Immunoblotting assay

스쿠티카충으로부터 얻은 PC-PLD의 분자량 및 그 아미노산의 구조를 확인하기 위하여 기존에 PLD로서 잘 알려져 있는 human PLD 1 (M.W 119 kDa)과 human PLD 2 type (M.W. 97 kDa), flounder PLD의 다클론항체를 이용하여 western blotting법으로 스쿠티카충의 PLD의 형태를 알아보하고자 하였다.

3. 숙주 감염시 PC 가수분해 효소의 기능

: 숙주 감염시 PC 가수분해 효소의 기능을 조사하기 위하여 넙치의 phagocytic cell와 nonphagocytic cell에 대한 영향을 조사하였다. 이를 위하여 아래의 실험을 실시하였다.

3.1. Phagocytosis activity assay

식작용의 측정은 Kwon 등 (2002)의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 식작용에 대한 영향을 측정하기 위하여 MS-222로 마취시킨 넙치의 두신을 절취한 후, 이것을 차가운 HBSS를 이용하여 nylon mesh에서 으갠 후 이것의 상층액을 미리 준비해둔 34/51% percoll (Sigma)용액에 넣었다. 400 × g, 30분 동안의 원심분리를 통하여 leukocyte를 모은 후 다시 heparin (10 U/ml), penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 U/ml)을 담고 있는 1 × HBSS에서 400 × g, 5분간 두 번 원심분리하였다. 세포의 수는 0.1% trypan blue로 염색 후, hematocytometer를 이용하여 1 × 10⁶ cell/ml이 되도록 하였다. 식작용의 자극제로서는 zymosan을 사용하였으며, 이것의 제조방법은 30분 동안 끓인 후 HBSS로 3회 세척하여 사용하였다. 식작용의 ROI는 automatic photoluminometer (Bio orbit 1251)을 사용하였으며, 각 test cuvette에는 0.7 ml luminol, 0.4 ml phagocyte cell, 0.4 ml의 샘플을 농도별로 넣은 후, 반응을 보았다. zymosan은 샘플을 넣기 20분 전에 넣은 후 반응을 일으킨 후 샘플을 넣어서 식작용의 유무를 측정하였다.

3.2. Viability assay

식작용 (CL assay) 측정하기 전, 후에 살아있는 식세포의 수를 0.1% trypan blue를 이용하여 그 수를 측정하였다. 먼저 막 유래의 choline releasing 활성 분획물과 세포질 유래의 choline releasing 활성 분획물을 각각 농도별로 넣은 후 식작

용 및 살아있는 식세포의 수를 측정하였다.

3.3. 어류 주화 세포주의 배양

어류주화세포는 여수대학교 수산생명의학과 오명주 교수님께서 분양받은 FFN, FSP (Kang et al., 2003) 및 CHSE-214 cell line이었으며, 본 실험실의 배양기에서 순치를 시켰다. 상기의 어류 주화세포 배양 조건은 DMEM 배지 (10% FBS, 100 U streptomycin & penicillin G), 20°C에서 세포의 수가 10^6 /ml이 되게 75 T plask에서 세포를 자라게 한 후, coverslip를 넣은 24 well plate (Corning)에서 다시 계대배양하였다. 계대배양하여 자란 세포는 상기와 같은 다양한 실험을 실시하였다.

3.4. Host cell-parasite attachment assay

스쿠티카충의 숙주세포나 조직에 대한 부착 및 침투시의 인지질가수분해효소의 역할을 규명하기 위하여 Wilkowsky 등 (2002)의 방법에 따라서 상기의 실험을 수행하였다. 먼저, 각 어류주화세포 및 조직은 10% FBS가 포함된 DMEM에서 배양되거나 혹은 1 × HBSS에서 분리 후 순치시켰다. 상기의 세포나 조직양에 대하여 일정량의 기생충 (10^7 parasite/ml)을 각 well에 넣은 후, 배양기에서 18시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well내의 기생충의 증식은 0.1% trypan blue와 동량으로 상층의 배지를 찍은 후, hemacytometer에서 기생충의 증식을 측정하였으며, 동시에 aspirator를 이용하여 배지를 제거하였다. 배지를 제거한 well은 1 × HBSS를 이용하여 2회 세척한 후, 각 well에 들어있는 coverslip를 제거하여 이것을 glass plate에 고정하였다. glass plate에 고정된 coverslip는 10% 중성포르말린으로 고정한 후, Giemsa stain을 실시하였다. Giemsa stain을 마친 후, 현미경하에서 coverslip 당 기생충의 부착수를 측정하였다.

III. 결 과

1. 스키테카충의 인지질가수분해효소의 부분정제

스쿠테카충으로부터 PC 가수분해 (Choline releasing activity)하는 효소의 존재를 알아보기 위하여 먼저 스키테카충으로부터 얻은 막 과 세포질 (cytosol) 추출물의 choline releasing activity을 측정하였다. Table 2.1에서 나타낸 바와 같이 (Table 2.1) PC 가수분해 활성은 막과 세포질에 모두 나타났으나, 주로 막에서 대략 67% 가량 존재함을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 하여 먼저 막과 세포질 추출물내의 choline releasing activity이 있는 부위를 정제하기 위하여 affinity Heparin-5PW HPLC 칼럼을 사용하여 분리하였다. 막 추출물의 경우 15-16 번 분획물 (fraction)과 27-30 분획물 등에서 높은 choline releasing activity이 관찰되었고 (Fig. 2.1), 세포질 추출물의 경우 9-18 분획물에서 높은 choline releasing activity을 나타내었다 (Fig. 2.2). 각각의 인지질 효소의 yield 및 specific activity는 peak A enzyme의 경우는 21%, 50.4 pmol/min/mg, peak B는 23%, 228 pmol/min/mg, peak C는 60%, 28.3 pmol/min/mg을 나타남을 알 수 있었다 (Table 2.2).

Table 2.1. Distribution of choline releasing activity in subcellular fractions of scuticociliates, *U. marinum*.

Step	Total protein (mg)	Total activity (pmol/min)	Specific activity (pmol/min/mg)	Relative Percentage
Membrane extract	16	685	42.1	67
Cytosol extract	38	332	8.7	33

Scuticociliate extracts were fractionated into cytosol and particulate fractions and assayed for choline releasing activity as described under "Materials and Methods". The results are from one experiment, typical of three.

2. 스쿠티카충의 PC 가수분해 효소의 동정

스쿠티카충의 막 및 세포질로부터 정제된 PC-hydrolyzing 활성을 나타내는 효소들이 PC-PLD, PC-PLC, 혹은 알려지지 않은 다른 효소인지를 확인하기 위하여 PC 가수분해효소의 대사산물들을 조사하였다. 이를 위하여, 먼저 막 추출물로부터 정제된 15-16번 분획물과 27-30번 분획물을 각각 모아서 peak A, peak B라고 명명하였으며, cytosol 추출물의 9-18번 분획물을 peak C라고 명명하였다.

2.1. PC-PLD의 동정

먼저 지용성 대사산물이 어떠한 형태를 띠는지를 autoradiography법을 이용하여 실험하였다. Fig. 2.3에 나타난 peak B는 PC 가수분해효소의 대사산물로 phosphatic acid (PA)를 생성하며, 10% 에탄올의 존재하에서는 transphosphatidylation의 반응에 의한 phosphatidylethanol (PEtOH)을 생성하였다. 2차 대사산물인 PEtOH는 PC-PLD의 중요한 특징 중의 하나인 일차 알콜 (primary alcohol)의 존재하에서 일어나는 phosphatidyltransfer 반응의 결과물로서 생성된다고 보고되고 있다 (Exton, 1997). 그러므로, peak B는 PC-PLD로 추정되었다. 이를 명확히 하기 위해 인공지질막 수용층의 산물을 분석한 결과 peak B의 산물에서 choline을 검출하였다 (Fig. 2.4). 또한, 각종 인지질가수분해효소 저해제하에서의 choline releasing 활성을 측정하였을시에 Table 2.3에서 보는 바와 같이 peak B는 인지질가수분해효소 저해제로 알려진 neomycin에 의하여 농도 의존적으로 억제를 보이거나, 선택적인 PI-PLC inhibitor인 U73122와 선택적인 PC-PLC inhibitor인 D609의 존재하에서는 아무런 영향을 받지 않았다. 따라서, 이 choline releasing 활성을 가지는 분획물인 peak B는 mPC-PLD로 명명하였다.

2.2. PC-PLC의 동정

스쿠터카충 막 유래의 PC-hydrolyzing 활성을 나타내는 분획물인 peak A와 세포질 유래의 PC-hydrolyzing 활성을 나타내는 분획물인 peak C는 지용성 대사산물로서 phosphatidylethanol (PEtOH) 및 phosphatidic acid (PA)는 생성하지 않았으나, diacylglycerol (DAG)만을 생성하였다 (Fig. 2.3). 생체내에서 DAG의 생성은 phosphatidylinositol hydrolyzing phospholipase C (PI-PLC)에 의해서 PIP_2 가 DAG와 Inositol triphosphate (IP_3)로 분해되는 과정을 통하여 생성되거나, 혹은 PC-PLC에 의하여 PC로부터 DAG와 phosphocholine으로 분해되는 과정을 통하여 생성된다고 알려져 있다 (Exton, 1997). 그러므로, 본 실험에서 peak A와 peak C의 PC 가수분해 활성은 PC-PLC의 활성일 것으로 추정되었다. 상기의 결과들을 더 명확히 하기 위해서 choline releasing 활성을 위한 인공 지질막의 수용층으로부터 얻은 대사산물들이 어떠한 형태인지를 조사하였다. Fig. 2.4에서 보는 바와 같이 막 유래의 PC-hydrolyzing 활성 분획물 (peak A)과 세포질 유래의 PC-hydrolyzing 활성 분획물 (peak C)의 경우는 그 생성물이 phosphocholine을 만들어 낸다는 사실을 보여주었다. 이는 PC-PLC의 반응 특징인 PC를 가수분해한 후 생성하는 대사산물이 phosphocholine이 생성되는 것으로 보아, peak A와 peak C는 PC-PLC로 확인되었다. 이를 더 명확히 하기 위하여 다양한 인지질가수분해효소 억제제하에서의 PC-hydrolyzing 활성을 측정하였다. Table 2.3에서 보는 바와 같이 peak A와 C는 인지질가수분해효소 저해제로 알려진 neomycin과 선택적인 PC-PLC inhibitor인 D609의 존재하에서 농도의존적으로 억제를 보이나, 선택적인 PI-PLC inhibitor인 U 73122의 존재하에서는 아무런 영향을 받지 않았다. 따라서, 이 두 효소 (peak A 와 C)는 PC-PLC임을 알 수 있었으며, 각각 mPC-PLC 및 cPC-PLC로 명명하였다.

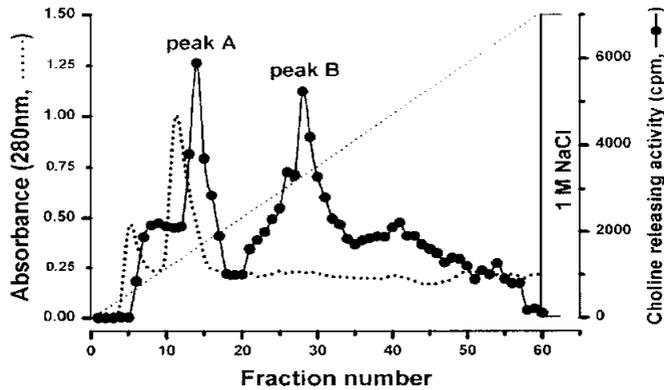


Fig. 2.1. Chromatography of choline releasing activity through Heparin-5PW HPLC column. Membrane from *U. marinum* were prepared, extracted, and processed as described under "Materials and Methods". Eluted fractions (1 ml) were assayed for protein (-) and choline releasing activity in the absence of GTP γ S and Arf (●).

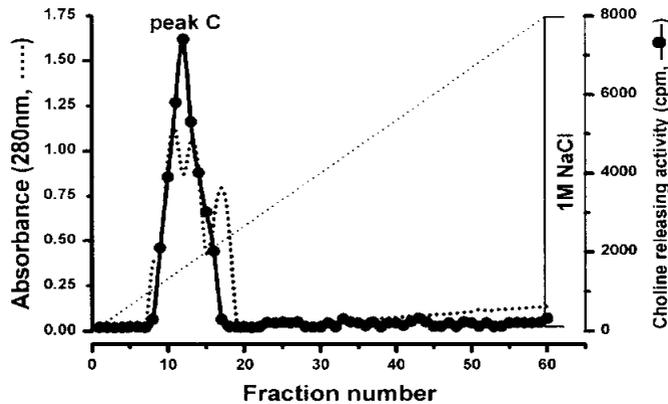


Fig. 2.2. Chromatography of choline releasing activity through Heparin-5PW HPLC column. Cytosol from *U. marinum* were prepared, extracted, and processed as described under "Materials and Methods". Eluted fractions (1 ml) were assayed for protein (-) and choline releasing activity in the absence of GTP γ S and Arf (●).

Table 2.2. Purification of phospholipases in *U. maritimum*.

	Step	Total protein (mg)	Total activity (pmol/min)	Specific activity (pmol/min/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Peak A enzyme	Membrane extract	16	685	42.1	1	100
	Heparin-5PW	2.9	142	50.4	1.2	21
Peak B enzyme	Membrane extract	16	685	42.1	1	100
	Heparin-5PW	0.7	159.6	228	5.4	23
Peak C enzyme	Cytosol extract	38	332	8.7	1	100
	Heparin-5PW	7	198	28.3	3.2	60

The extract and eluted fraction were incubated with phospholipids vesicles in reaction mixture. The substrate vesicles comprised PE, PIP₂ and PC in a molar ratio of 16:1.4:1 with [*choline-methyl*-³H(pam)₂]PC to yield 200,000 cpm per assay. After incubation for 1 h at 37°C, the supernatant was analyzed by Liquid Scintillation Counter (LSC).

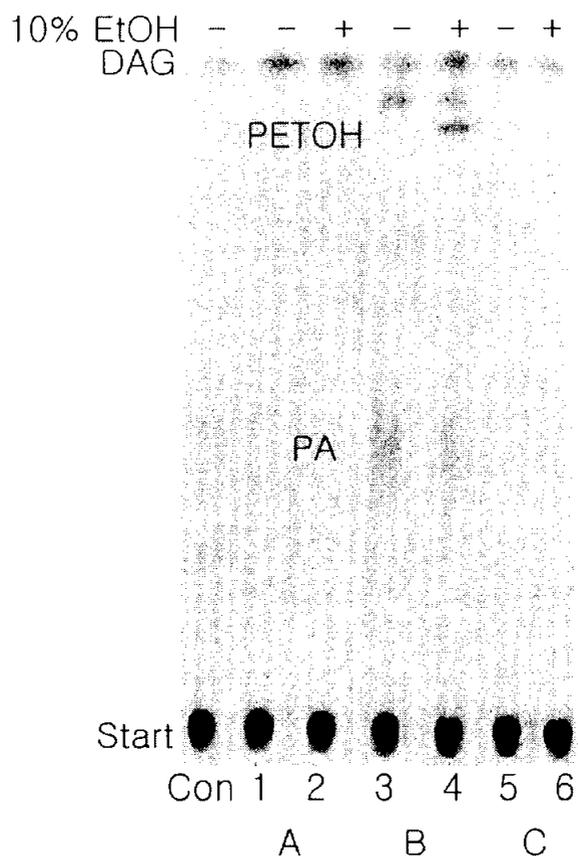


Fig. 2.3. Reaction products formed in lipidic phase. The active fraction from a Heparin-5 PW HPLC column was incubated with phospholipids vesicles in reaction mixture without (C, lane 1, lane 3) and with (lane 2, lane 4) 0.67% (v/v) ethanol. The substrate vesicles comprised PE, PIP₂, and PC in a molar ratio of 16:1.4:1 with [2-*palmitoyl*-9,10-³H]dipalmitoyl PC to yield 200,000 cpm per assay. After incubation for 1 h at 37°C, the lipid products were analyzed by TLC and visualized by Cyclone Phosphor Imager. The positions of PC, PA, and PEtOH are indicated. Lane C, represents control (substrate alone); Lane 1 & 2, peak A; Lane 3 & 4, peak B; Lane 5 & 6, peak C.

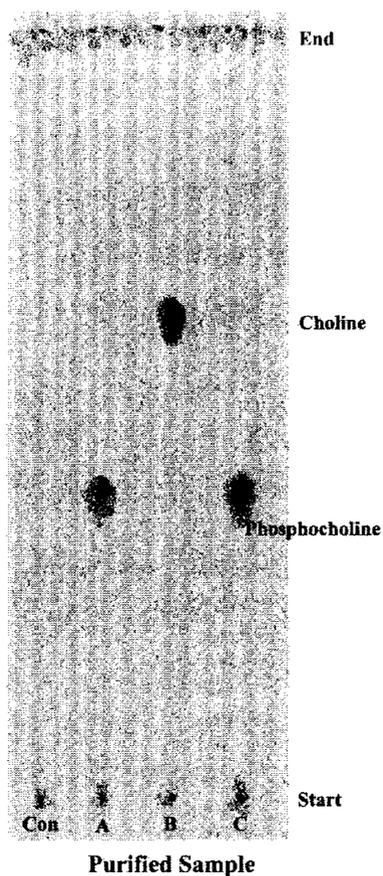


Fig. 2.4. Reaction products formed in aqueous phase. The active fraction from a Heparin-5PW HPLC column was incubated with phospholipids vesicles in reaction mixture. The substrate vesicles comprised PE, PIP₂, and PC in a molar ratio of 16:1.4:1 with [*choline-methyl*-³H(pam)₂]PC to yield 200,000 cpm per assay. After incubation for 1 h at 37°C, the lipid products were analyzed by TLC and visualized by Cyclone Phosphor Imager.

Table 2.3. Inhibition peak A, B and C enzyme by various inhibitors.

Subfamily	Compound Inhibitor	Concentration (μM)	Enzyme Activity (% Control)		
			peak A	peak B	peak C
PC-PLC	D609	10	71	108	68
		100	58	102	44
		200	36	98	30
		400	32	101	28
PI-PLC	U 73122	1,000	108	108	100
		10,000	98	95	99
phospholipase	Neomycin sulfate	10	88	78	90
		100	50	54	71
		1,000	47	47	38
		10,000	46	44	37

The purified *U. marinum* peak A, B and C enzyme was preincubated with the indicated inhibitors and assayed for residual activity using phospholipid vesicle as substrate. Choline releasing activity was done from four independent experiments.

3. 스쿠티카층의 mPC-PLD, mPC-PLC 및 cPC-PLC의 생화학적 특성

3.1. mPC-PLD 의 분자생화학적 특성

분리한 PC-가수분해 효소의 생화학적 특성은 choline releasing 활성 분석시의 배양 시간, 배양온도, pH, 마그네슘 및 칼슘 이온농도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 다양한 인지질의 변화에 따른 기질 특이성 등을 조사하였고, 각종 PC-PLD 항체의 존재하에서의 번역반응을 통한 생화학적 특성을 조사하고자 하였다.

mPC-PLD의 활성은 배양시간 및 배양온도가 증가함에 따라 증가하였으며 (Fig. 2.5 A and C) 90분 및 37°C에서 가장 큰 활성이 관찰되었다. pH 변화에 대한 영향을 보았을시 적정 pH가 7.5인 중성 PLD임을 알 수 있었다 (Fig. 2.5B). 현재 많은 문헌에서 보고되고 있는 포유류의 인지질가수분해효소들은 효소의 활성을 나타내는데 있어서 마그네슘이나 칼슘 이온 등의 존재가 필수적이라고 알려져 있다 (Exton, 1997; 2002; Kurz et al., 2004). 따라서, 본 연구에서도 mPC-PLD의 활성에도 마그네슘이나 칼슘이온 등이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. Fig. 2.5D에서 보는 바와 같이 mPC-PLD는 각각 2.5 mM Mg^{2+} 및 1.6 mM Ca^{2+} 이온 농도하에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 mPC-PLD도 포유류 PC-PLD와 마찬가지로 마그네슘 및 칼슘이온이 *in vitro* 상의 PLD 활성에 중요한 cofactor임을 제시하였다. 또한, 인공지질막내의 구성성분인 PC, PE, PIP_2 의 양의 변화에 따른 choline releasing 활성의 변화를 조사하였다. mPC-PLD의 활성은 PC 및 PE의 경우에는는 고농도를 제외하고는 PC 및 PE의 농도에 영향을 받지 않았다 (Fig. 2.6 A and B). 그러나, PIP_2 에 대하여서는 mPC-PLD의 활성은 농도 의존적인 활성을 나타내었다 (Fig. 2.6). 이 결과로서 mPC-PLD는 PIP_2 -dependent PLD로 추정되었다. 대부분의 고등척추동물인 포유류에서의 PC-PLD isotype은 small G protein-dependent-, oleic acid dependent-, Ca dependent-PLD isotype 등으로 존재한다고 알려져 있다 (Exton, 1997; 2002), 따라서,

본 실험에서 스쿠티카충의 mPC-PLD가 *in vitro* 상에서 활성의 cofactor로서 small G protein류 및 oleic acid의 필요성을 조사하였다. 본 실험에서 보는 바와 같이 mPC-PLD는 Arf와 GTP γ S등과 같은 small G protein류와 oleic acid의 존재가 *in vitro* 상에서 mPC-PLD의 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다 (data not shown). 따라서, 스쿠티카충의 mPC-PLD는 다른 형태의 PC-PLD로 추정되어졌다. 현재 포유류에서 발견되는 PC-PLD의 분자량등은 대개 97 kDa, 118 kDa 정도 크기의 2개의 형태로 알려져 있는데 (Exton, 1997; 2002), 본 실험에서 얻은 mPC-PLD가 포유류 유래의 PC-PLD와 유사한 크기인지를 확인하기 위하여 human PLD 1 antiserum, human PLD 2 antiserum 및 넙치 유래의 PLD antiserum에 대한 면역 분석을 실시하였다. Western blotting을 실시하였을시에 어떠한 면역학적 반응 (cross reaction)이 나타나지 않는 것으로 보아 아마도 스쿠티카충의 mPC-PLD의 크기는 고등척추동물과는 다른 형태의 PLD isotype으로 추정되었다 (data not shown).

3.2. mPC-PLC 및 cPC-PLC의 분자생화학적 특성

분리한 mPC-PLC 및 cPC-PLC의 활성에 대한 배양시간, 배양온도, pH, 마그네슘 및 칼슘 이온농도의 영향을 조사하였으며, 다양한 인공지질막내의 구성성분인 PC, PE, PIP₂의 양의 변화에 따른 두 효소들의 활성 변화도 조사하였다. 두 효소는 배양 시간 및 배양온도에 의존적으로 효소 활성을 나타내었다 (Fig. 2.7 A and C). 두 효소의 pH 변화에 대한 영향을 조사하였을시에 mPC-PLC는 6.0, cPC-PLC는 7.0에서 가장 큰 활성을 나타내었다 (Fig. 2.7B). 현재 *in vivo* 및 *in vitro* 상에서 PC-PLC 효소의 활성에 있어서 마그네슘이나 칼슘 이온 등의 존재에 대한 영향은 전혀 알려져 있다. 따라서, 본 실험에서는 두 효소가 마그네슘 및 칼슘이온의 다양한 변화하에서 효소 활성의 변화를 측정하였다. 두 효소는 각각 마그네슘이온에 대한 영향에서는 2.5 mM 농도하에서 가장 큰 활성을 나타냈으나, 칼슘이온에 대한 영향에서는 0.4

mM 농도하에서는 mPC-PLC가 1.6 mM 에서는 cPC-PLC가 가장 큰 활성을 나타내었다 (Fig. 2.7D). 따라서, PC-PLC의 활성도 *in vitro* 상에서 choline releasing 활성을 나타내기 위해 마그네슘과 칼슘이온이 중요한 cofactor 인을 추정할 수 있었다. 이 두 효소가 인공지질막내 구성성분인 PC, PE, PIP₂의 양의 변화에 따른 choline releasing 활성의 변화를 조사하였다. mPC-PLC는 PC 농도가 증가함에 따라 활성이 감소하며, PE 및 PIP₂의 농도변화에 의해서는 농도의존적인 활성을 나타내었다. 반면에, cPC-PLC는 PC 및 PE에 농도 의존적으로 활성이 증가함을 알 수 있으나, PIP₂의 농도가 증가함에 따라서는 choline 활성이 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 2.8).

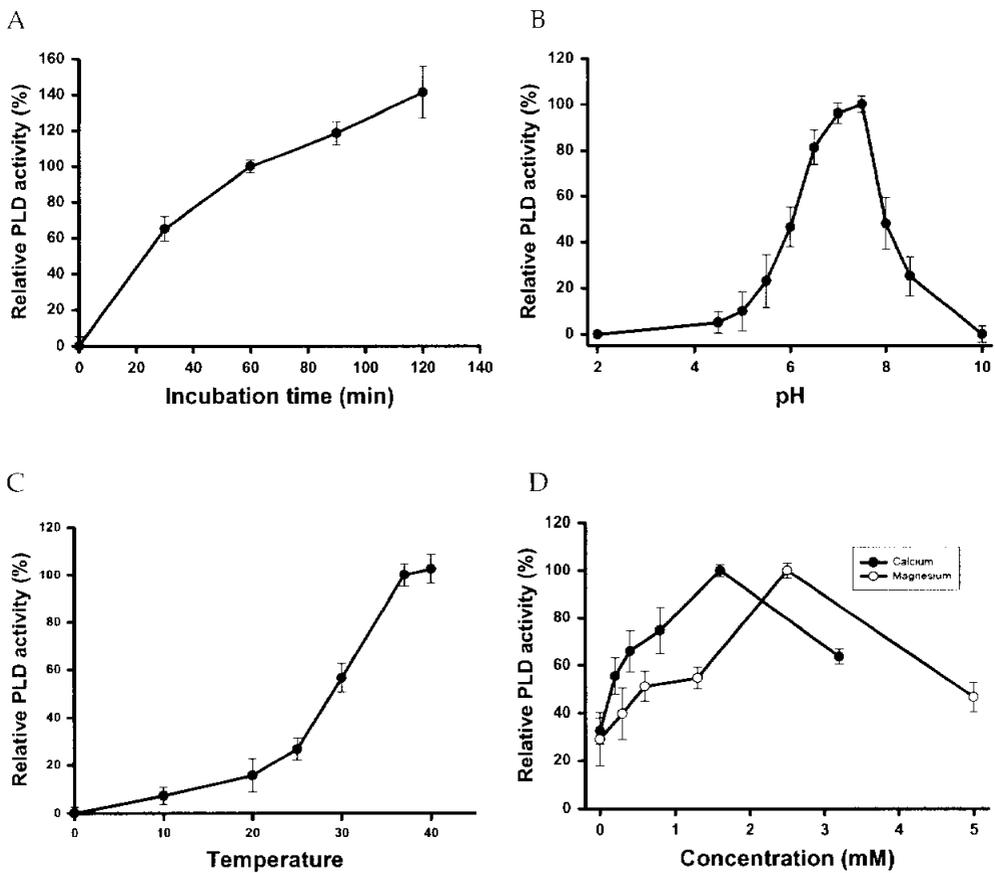


Fig. 2.5. Effects of incubation time (A), pH (B), temperature (C), and Ca^{2+} & Mg^{2+} (D) on PLD activity. The mPC-PLD was incubated with phospholipid substrate vesicles in reaction mixture under various conditions. Results are the mean \pm S.D. from four independent experiments.

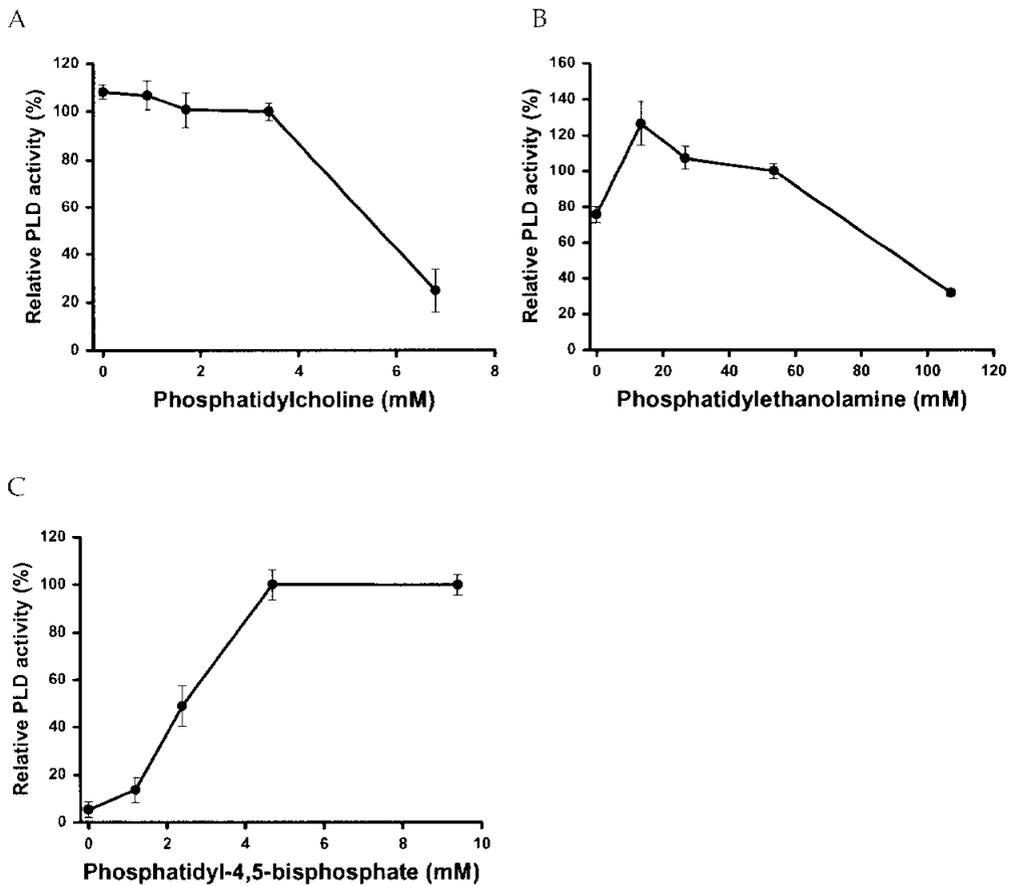


Fig. 2.6. Effects of phospholipids on PLD activity. The mPC-PLD was measured in the presence of five different concentrations of PC (A), PE (B) and PIP₂ (C). Results are the mean±S.D. from four independent experiments.

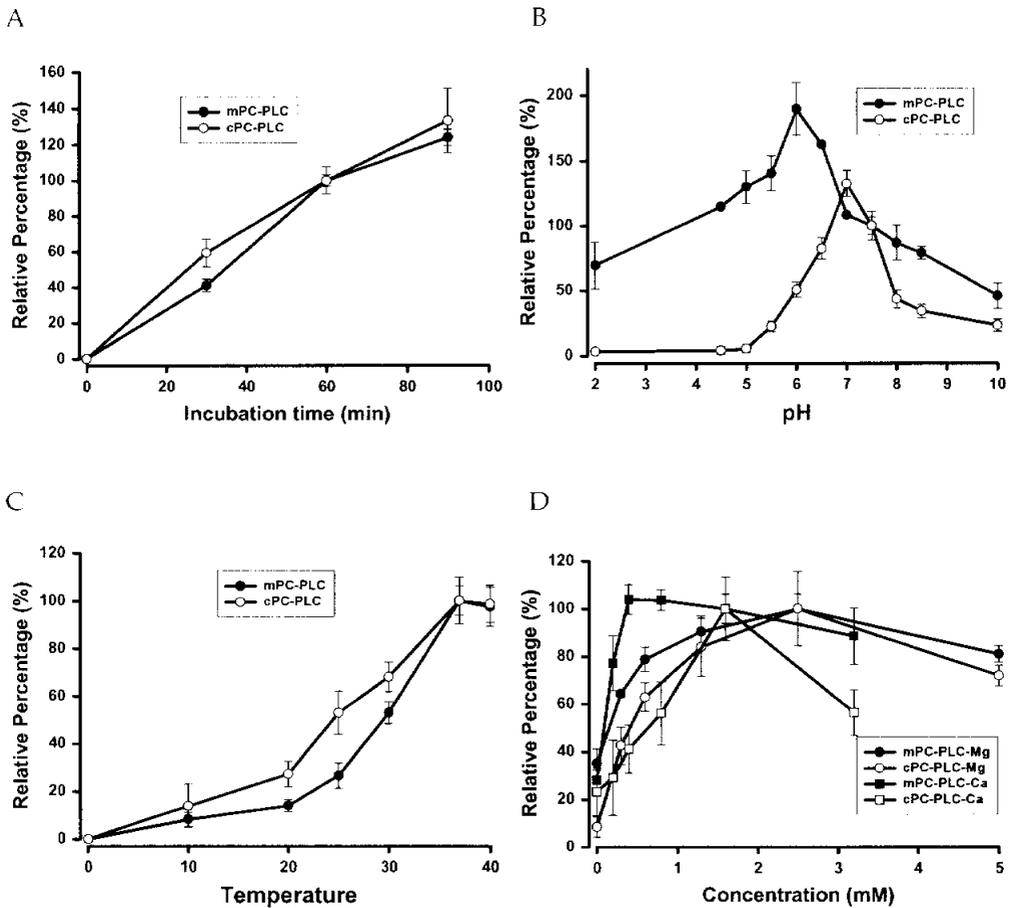


Fig. 2.7. Effects of incubation time (A), pH (B), temperature (C), and Ca^{2+} & Mg^{2+} (D) on choline releasing activity. The mPC-PLC and cPC-PLC were incubated with phospholipid substrate vesicles in reaction mixture under various conditions, respectively. Results are the mean \pm S.D. from four independent experiments.

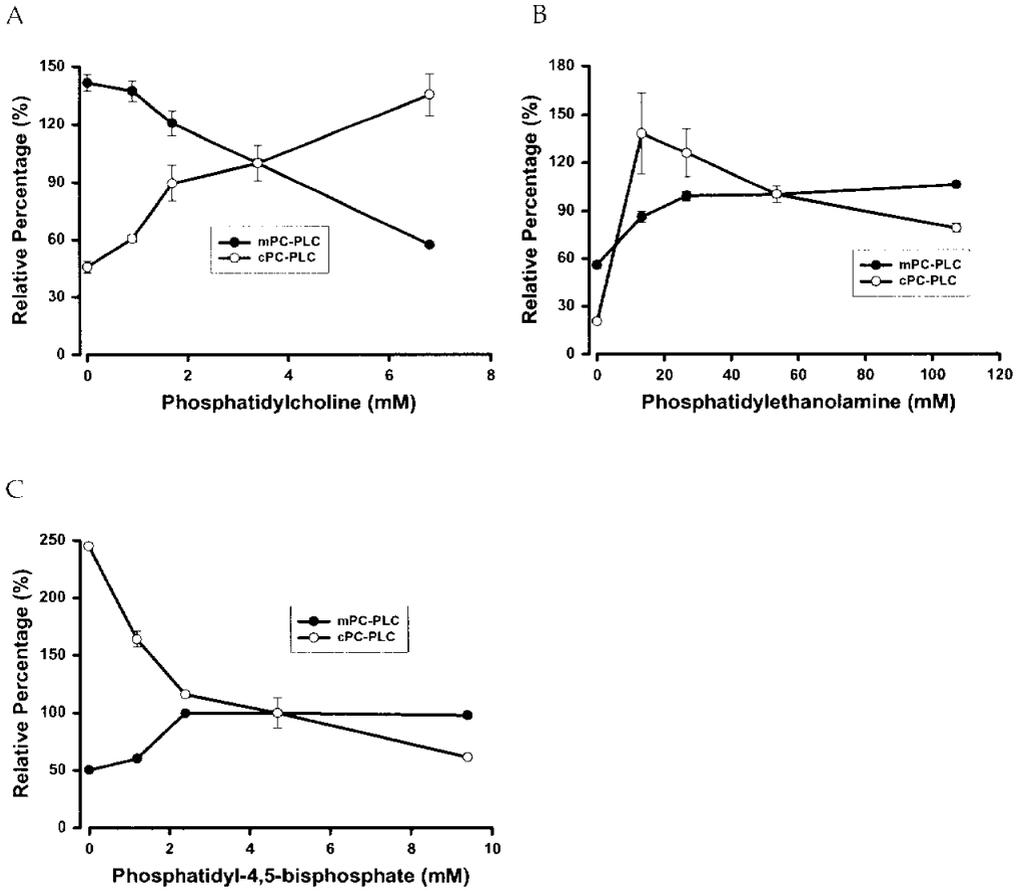


Fig. 2.8. Effects of phospholipids on mPC-PLC and cPC-PLC activity. The mPC-PLC and cPC-PLC were measured in the presence of five different concentrations of PC (A), PE (B) and PIP₂ (C), respectively. Results are the mean±S.D. from four independent experiments.

4. 숙주 감염시 PC가수분해 효소의 기능

스쿠티카충 유래의 mPC-PLD, mPC-PLC 및 cPC-PLC가 숙주감염시의 기능을 조사하기 위하여 넙치 식세포 (leukocyte)의 생존율 및 식활성을 측정하였다. 또한 어류 주화세포에 대한 상기 효소의 존재하에서 스쿠티카충의 부착율을 측정하기 위하여 parasite host cell attachment assay를 실시하였다.

4.1. mPC-PLD의 영향

Zymosan에 의해 자극된 넙치 식세포의 CL 반응 및 생존율 (cell viability)은 mPC-PLD의 투여에 의해서 별다른 영향을 받지 않았다. 또한, 어류주화세포에 대한 스쿠티카충의 부착율도 mPC-PLD에 의해 별다른 영향을 받지 않았으며, 도리어 상층액의 스쿠티카충이 cyst를 형성하는 것을 나타내었다 (data not shown).

4.2. mPC-PLC 및 cPC-PLC의 영향

Zymosan에 의해 자극된 넙치 식세포의 CL 반응시 mPC-PLC의 투여는 별다른 영향을 받지 않았으나 cPC-PLC의 투여는 농도 의존적으로 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 2.9). 게다가, CL 반응 후 식세포의 살아있는 수를 측정하였을시에도 cPC-PLC의 경우에서만 유의성 있는 감소가 나타났으며, mPC-PLC의 경우에는 별다른 영향을 받지 않았다 (Fig. 2.10). 이 결과들로 미루어 cPC-PLC는 넙치 식세포에 대한 virulence factor로서 작용하지 않는가 사료되었다.

어류주화세포에 대하여 mPC-PLC와 cPC-PLC의 투여가 스쿠티카충의 부착율에 대한 영향을 조사하였을시에 Table 2.4에서 보는 바와 같이 mPC-PLC를 스쿠티카충과 함께 어류주화세포에 넣을 시에는 별다른 영향이 없었으나, cPC-PLC를 스쿠티카충과 함께 어류주화세포에 넣을 시에는 농도 의존적으로 약간의 부착율이 증가되는 경향을 나타내었다. 게다가, PC-PLC 억제제인 D609를 어류 주화 세포에 전 처리한 후,

스쿠티카충을 감염 시켰을시에 스쿠티카충의 부착이 완전히 차단이 됨을 알 수 있었다 (Table 2.4).

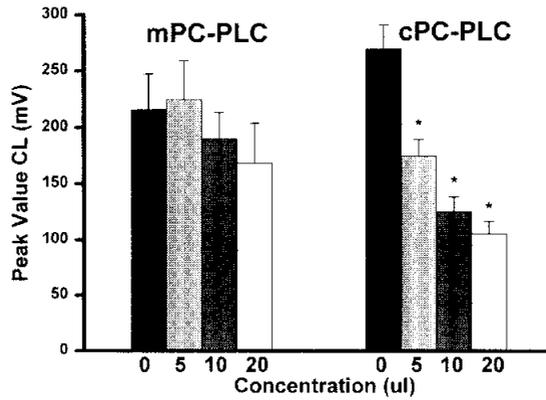


Fig. 2.9. Inhibition of zymosan-induced CL in olive flounder, *P. olivaceus* phagocytes by mPC-PLC and cPC-PLC of *U. marinum*. In control (Con), 0.4 ml HBSS was added instead of sample. Results are the mean±S.D. from four independent experiments. The different letters above the bars denote statistically significant difference ($P<0.05$). black, 5 μl ; gray, 10 μl ; gray-blue, 20 μl .

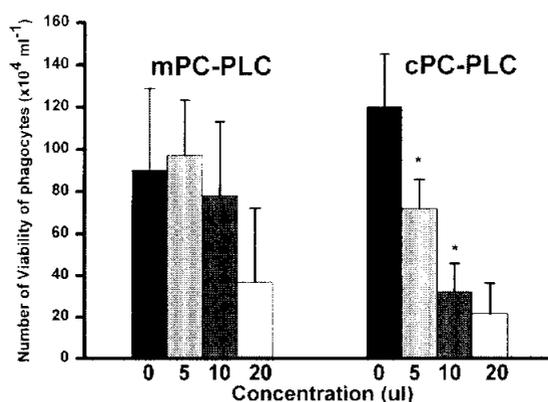


Fig. 2.10. Number of olive flounder phagocytes showing viability after chemiluminescence (CL) assay. After CL assay, the number of viable phagocytes was counted in each cuvette by the 0.1% Trypan blue exclusion test. Results are the mean±S.D. from four independent experiments. The different letters above the bars denote statistically significant difference ($P<0.05$). black, 5 μl ; gray, 10 μl ; gray-blue, 20 μl .

Table 2.4. Effect of mPC-PLC, cPC-PLC, and D609 on cell attachment by *U. marinum*.

	Attached parasites/coverlips
Control	152±78
Parasites pretreated with D609	14±13
Parasites pretreated with mPC-PLC (9 μg)	138±45
Parasites pretreated with mPC-PLC (18 μg)	145±72
Parasites pretreated with mPC-PLC (36 μg)	124±72
Parasites pretreated with cPC-PLC (16 μg)	152±34
Parasites pretreated with cPC-PLC (32 μg)	169±28
Parasites pretreated with cPC-PLC (64 μg)	184±44

Results are expressed as means from three replicate coverslips±S.D.

Parasites or cells were pretreated with 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D609 for 2 h before infection.

IV. 고 찰

현재 다양한 종에서 분리되는 PC-PLD는 모든 세포에 존재하는 효소이며 대부분 당질화된 인지질에 붙어 있는 효소로 존재하며, 현재 해양 섬모 원충류에서 PC-PLD의 기능 및 특성에 대한 연구가 많이 보고되고 있다(Kovacs et al., 1996; Kovacs et al., 1997; Rasmussen and Rasmussen, 1999, 2000; Wang et al., 2001).

현재 포유류의 다양한 종으로부터 PLD가 부분 정제되거나, 클로닝 및 발현되어져 그 특성이 다양하게 규명되고 있다. 돼지 폐 (lung)의 microsome으로부터 부분 정제된 PLD는 대략 1.7 pmol/min/mg 정도의 특이한 활성을 나타내고 PLD의 대사산물인 PA와 PEtOH를 생성한다고 보고되고 있다 (Okamura and Yamashita, 1994). 또한, Nakamura 등 (1995)은 포유류 PLD가 암모늄 처리와 nucleotide에 의해서 활성화되며, 각 장기 중 신장내의 PLD가 대략 454 pmol/min/mg으로 가장 큰 활성을 나타낸다고 보고되고 있다. 이러한 것을 바탕으로 하여 볼 때, 스쿠티카충의 mPC-PLD 활성은 228 pmol/min/mg 정도를 나타내므로 포유류의 PC를 가수분해하는 효소의 활성 수치보다 약한 활성을 나타내었다. 또한, 대개 막 유래 PLD (membrane bound PLD) 활성은 RhoA, Cdc42, Rac, GTP γ S 등과 같은 small G protein 류에 의하여 활성화되어진다고 보고되나 (Kwak et al., 1995; Malcolm et al., 1994; Ohguchi et al., 1996; Siddiqi et al., 1995), 본 실험에서 얻어진 스쿠티카충 mPC-PLD의 활성에 있어서 small G protein 인 Arf와 GTP γ S는 PLD 활성에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 더불어, 포유류 유래 PLD는 칼슘, 마그네슘 및 PIP₂ 등에 의하여 의존적인 활성을 나타낸다고 보고되나 (Exton, 1997, 2002; Kurz et al., 2004), 돼지 폐 및 사람 태반 (placenta) 유래의 PLD는 칼슘과 마그네슘이 PLD 활성에 중요한 cofactor가 아니라고 보고되고 있다 (Vinggaard and Hansen, 1995; Okamura and Yamashita, 1994). 스쿠티카충의 mPC-PLD는 마그네슘 및 칼슘이온이 PLD 활

성에 있어서 중요한 cofactor로 작용하며, 중성 PLD임을 알 수 있었다. 또한, PLD 활성화에 있어서 포유류와는 달리 small G protein 이나 oleic acid와 같은 cofactor가 필요하지 않았다. 이는 포유류 등에서 보고된 PLD와는 다른 PLD 활성을 가지지만, PLD 활성화에 있어서 중요한 cofactor로 이가 이온이 중요하게 작용한다는 사실을 알 수 있었다.

포유류 조직에서 1973년에 최초로 PLD가 보고된 이후로 포유류 PLD의 분자량 및 생화학적 특성에 대하여 많이 보고되고 있는데, 이중 사람에게서 클로닝된 hPLD 1 및 2 type의 형태는 각각 124 와 97 kDa 의 크기이며, 각각 다양한 인자 (small G protein, PIP₂, oleate, detergent, Ca²⁺)등에 의해 효소가 활성화된다고 보고하였다 (Exton, 1997). 포유류에서 PLD 1 type은 perinuclear, endoplasmic reticulum, Golgi, late endosomes 등에 많이 분포하며, PLD 2 type은 plasma membrane에 많이 분포한다고 보고되었다 (Colley et al., 1997; Exton, 2002). 이 중 스쿠티카충으로부터 얻은 mPC-PLD의 분자량을 규명하고자 두 종류의 hPLD I, hPLD II type 및 어류 PLD (flounder) antibody에 대한 western blotting을 실시하였으나, 면역 반응 (cross reaction)이 나타나지 않았다 (data not shown). 이는 스쿠티카충 mPC-PLD가 기존에 알려진 *L. donovani*의 PLD와 다른 형태의 PC-PLD가 아닌가 사료되었다 (Blum et al., 2001).

현재 포유류 면역 세포에서 PC-PLD가 활성화 되었을시에 다양한 면역 조절 factor로서 neutrophils에서는 IgG-stimulated degradation (Grewirtz and Simons, 1997), mast cell 에서는 IgE의 자극에 의한 histamine과 arachidonic acid를 유리한다고 보고되는데 (Lin et al., 1991), 이러한 PC-PLD에 의해 생성되는 PA가 최종적으로 NADPH oxidase를 활성화시켜 macrophage의 respiratory burst에 관여한다고 보고

되고 있다 (Kusner et al., 1996; Lennartz, 1999). 따라서, 스키테카충으로부터 얻은 mPC-PLD의 넓치 macrophage에 대한 식작용의 변화를 조사 하였을시에 적은 양의 mPC-PLD의 존재하에서 넓치 macrophage의 CL 및 식세포의 생존의 수치에 대하여 별다른 영향이 없는 것으로 나타났었다. 원충류 기생충들은 세포에 부착하여 살아가거나 혹은 free living organism으로 살아가면서 외부 환경의 변화에 의해 숙주에 침투하여 번식할 수 있다. 세포에 대한 부착시 기생충들은 특이한 효소를 내는 것으로 알려져 있는데 그 중 phospholipase A2 (PLA2)와 PLD를 *T. cruzi* 배양액에 넣을시에 host-parasite attachment가 증가된다고 보고하였다 (Connelly and Kierszenbaum, 1984, 1985). 또한, *T. gondii*에서 인지질가수분해효소는 침투(penetration)에 관여한다고 보고되었다 (Saffer and Schwartzman, 1991). 이 결과들은 인지질내에 존재하는 PLA2와 PLD들이 host-parasite의 상호관계에서 중요한 매개체의 역할을 하리라는 것을 암시해준다. 그러나, 스키테카충의 mPC-PLD의 숙주-기생충 부착율을 측정시 별다른 영향이 없었으나, 어류 주화세포배지의 상층액에서 스키테카충의 cyst 형성이 나타나므로 보아, 스키테카충의 mPC-PLD가 아마도 외부 환경변화에 대하여 *T. gondii*의 기능과 유사한 스키테카충의 cyst formation에 관여하지 않는가 추정되거나, 혹은 *L. donovani* 종에서 PC-PLD가 급성 (acute) osmotic stress에 대한 조절능력을 가진다고 보고되므로 (Blum et al., 2001), 스키테카충 mPC-PLD도 이와 같은 역할을 하지 않는가 추정되어졌다.

본 실험에서 스키테카충으로부터 2 종류의 PC-PLC를 정제 하였다. 두 종류의 mPC-PLC 및 cPC-PLC의 분자생화학적 특성을 통하여 각각 서로 다른 형태의 활성을 지니고 있음을 알 수 있었다. 스키테카충의 mPC-PLC는 acidic 활성을 가지며, 0.4 mM Ca^{2+} , 2.5 mM Mg^{2+} 이온의 존재하에서 가장 큰 활성을 나타내었으나, cPC-PLC (peak C)는 neutral 활성을 가지며, 1.6 mM Ca^{2+} , 2.5 mM Mg^{2+} 이온의 존

재하에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 이 결과들로 미루어서 스쿠티카충의 PC-PLC도 포유류에서 발견되는 PC-PLD의 활성에 있어서 중요한 필수인자인 이가 양이온이 PC-PLC의 활성에 있어서도 cofactor로서 작용한다는 사실을 추정할 수 있었다. 이는 세균류에서 동정되어지는 PC-PLC가 활성을 위하여 칼슘 및 아연 이온이 필요하다는 사실과 유사한 결과이다 (Preuss et al., 2001). 다양한 세균류에서 동정되어지는 PC-PLC는 기질로 PC를 가수분해하는 것뿐만 아니라, sphingomyelin, PE, PS, PI 및 hemolysis 활성도 함께 가진다고 보고되었다 (Jepson and Titball, 2000). 이를 바탕으로 스쿠티카충의 mPC-PLC는 PC의 양이 증가하면 활성이 감소하나, PE와 PIP₂의 양에는 농도의존적이며, cPC-PLC는 PC, PE에 농도의존적이며, PIP₂의 양에는 비의존적으로 나타났다.

스쿠티카충으로부터 유래되는 PC-PLC의 숙주감염시의 기능을 규명하기 위하여 넙치 식세포의 활성에 대한 영향 및 nonphagocytic 에 대한 host-parasite attachment assay를 수행하였다. 본 실험에서 스쿠티카충의 mPC-PLC와는 달리 cPC-PLC는 넙치 식세포의 수를 감소시키고 어류 식세포의 식활성을 억제하였다. 이는 숙주인 넙치 식세포의 antioxidant enzyme의 활성에 의하여 식활성을 억제시키거나, 혹은 직접적으로 식세포에 대한 damage를 주는 것으로 추정되어졌다. 대개 숙주세포에 대한 기생충의 침투시에 많은 효소가 관여한다고 알려져 있는데 특히, *T. cruzi*에서는 G-protein 류 단백질 (GTPase, dynamin, Rab5, Rab7, ecto-ATPase), phospholipase 류 (PI-PLC, PLA2, PLD, PC-PLC), protease 류 활성이 관여한다고 보고되기도 한다 (Wilkowsky, 2002; Bisaggio and Peres-Sampaio, 2003). 이 중에서, *T. gondii*에서는 PC-PLC가 중요하게 숙주세포에 대한 기생충의 침입시에 중요한 효소로 작용한다고 보고되고 있다. 이 PC-PLC의 영향은 *T. gondii*에서 PC-PLC의 특이적인 길항제인 D609의 전처리로서 숙주세포에 대한 침투능력을 조사하므로써 보고되었다 (Ricard

et al., 1999). 일반적으로 D609는 항바이러스 및 항종양성 물질로 만들어졌으나, 섬유아세포 (fibroblast)에서 PC-PLC의 활성을 억제한다고 보고되고 있다 (Sauer et al., 1984; Amtmann and Sauer, 1987). 본 실험에서 보는 바와 같이 D609의 존재하에서 스킨카충의 어류 주화세포에 대한 부착율이 억제되며, 외인성 cPC-PLC의 첨가가 어류주화세포에 대한 스킨카충의 부착율이 약간 증가되어짐을 나타내었다. 이러한 결과들을 바탕으로 하여 볼 때, 스킨카충의 mPC-PLC는 아마도 스킨카충의 생리적 기능에 관여하는 것으로 대개 진행 세포의 조절대사기능들과 유사한 역할을 하리라 추정된다. 그에 반해 스킨카충의 cPC-PLC는 다양한 역할을 하리라 생각되는데 특히, 넙치식세포에 대한 식작용의 영향 및 host-parasite attachment 실험을 통하여 이 단백질이 숙주의 침투시에 중요한 인자로 관여한다는 사실을 알 수 있었다.

V. 요약

본 장에서는 스퀴티카충내의 인지질 가수분해효소의 생화학적 특성 및 그 기능을 조사하였다. 스퀴티카충으로부터 PC를 특이적으로 분해하는 2종류의 가수분해효소를 부분 정제하였다. 스퀴티카충의 막으로부터 PLD (mPC-PLD)를 얻었으며, 막 및 세포질에서 PLC (m- & cPC-PLC)를 각각 얻었다. 이 효소들의 생화학적 특성 및 생리적 기능을 규명하였다.

1. 스퀴티카충으로부터 얻은 PC-PLD의 특성

스큐티카충의 막 유래의 PC-PLD (mPC-PLD)는 heparin 칼럼에 친화성을 가지면서 분리되어지며, 228 pmol/min/mg 정도의 특이한 활성을 나타내었다. PLD 활성화에 있어 GTP γ S 및 Arf와 같은 small G protein의 존재 없이도 활성을 가졌다. 다양한 human PLD 1, 2 및 어류 PLD 항체에 대하여 면역반응을 나타내지 않으므로 전혀 새로운 형태의 PC-PLD임을 알 수 있었다. 생화학적 특성을 통하여, 37°C, pH 7.5에서 가장 큰 활성을 나타내며, 각각 1.6 mM Ca²⁺, 2.5 mM Mg²⁺이온의 존재하에서 PLD의 가장 큰 활성을 나타냄을 또한 알 수 있었다. 이러한 것은 대부분의 PLD효소의 특성과 같이 Ca²⁺ and Mg²⁺ 이 *in vitro*의 PLD 활성화에 있어서 중요한 cofactor임을 나타낸다. 이 효소는 PLD inhibitor인 neomycin에 의해서 억제되나, 다양한 PLC 저해제인 U 73122, D609등에 의해서는 아무런 반응이 나타나지 않았다. 이 효소의 스퀴티카충에서의 기능을 규명하기 위하여 각종 어류 주화세포에 있어서 스퀴티카충의 세포 부착율에 있어서 이 효소의 영향을 조사하였을시에 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 더불어, 넙치식세포에 대한 CL 반응을 조사하였을시에 유의성 있는 넙치식세포의 식활성의 변화를 나타내지 않았으며, 또한, 식세포의 생존율에도 별 영향을 나타내지 않았다. 이러한 것으로 미루어 스퀴티카충의 PLD는 아마도 스

쿠티카층의 성장, 분화 및 대사와 같은 생리적 기능에 관여하리라 추정된다.

2. 스키투리카층으로부터 얻은 PC-PLC의 특성

스쿠티카층으로부터 얻은 PC-PLC는 heparin 칼럼을 통하여 정제되어졌으며, 막과 세포질에서 각각 두 종류를 얻었다. [*choline-methyl-³H](pam)₂PC를 이용한 choline releasing activity로서 각각 1.2, 3.2 배와 21%, 60%의 정제율을 얻을 수 있었다. 각각의 효소의 특성화를 통해서 막 유래의 PC-PLC는 적정 pH 6.0 이나 세포질 유래의 PC-PLC는 적정 pH 7.0이며, Ca²⁺ and Mg²⁺ 는 *in vitro*에서 PC-PLC 활성화에 있어서 중요한 cofactor로서 요구되어졌다. 게다가, 각 효소들은 선택적인 PC-PLC 억제제인 D609에 의해서 억제되나, PI-PLC 억제제인 U 73,122에 의해서는 억제되지 않았다. PC-PLC의 스키투리카층을 일으키는데 있어서의 역할로서 이 효소는 넵치식세포의 CL반응을 감소시키는 능력을 지님을 알 수 있었으며, 이러한 CL 반응의 감소는 세포질 유래의 PC-PLC가 대조구와 비교시에 유의성 있게 나타났다. CL 반응 후 식세포의 생존율 또한 세포질 유래의 PC-PLC에서 유의성 있게 감소되었다. 더불어, nonphagocytic cell line에 있어서 이 효소들의 host-parasite attachment를 실험하였을시 세포질 유래의 PC-PLC의 첨가는 부착율을 증가시키나, 막 유래의 PC-PLC는 아무런 영향이 없었으며, D609의 존재하에서는 스키투리카층의 부착율이 완전히 억제되어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 아마도 세포막 유래의 PC-PLC는 스키투리카층의 생리적 기능에 관여하는 것으로 보아지나, 세포질 유래의 PC-PLC는 숙주세포에 침투시에 중요한 인자로서 작용하지 않은가 추정되어진다.*

제 3 장 스쿠티카충의 단백질 분해효소의 특성 분석

1. 서 론

최근에 기생충으로부터 단백질분해효소 (protease)의 클로닝, 분리 및 특성에 대한 연구가 많이 보고되고 있다. 이들 대부분 결과들은 인간에 감염되는 기생충들을 대상으로 하여 연구되며 주로 helminth와 protozoa 계통의 종들로 이루어져 있다. 이러한 proteolytic enzyme인 protease는 숙주 (host)와 기생충 (parasite)간의 pathogenesis 및 숙주 방어에 밀접한 연관성이 있으며, 기생충의 nutrition에도 매우 밀접하다고 보고되고 있다 (Mckerrow 1989, North and Lockwood 1990). Protease는 peptide chain에 어떻게 작용하느냐에 따라 endopeptidases와 exopeptidases로 분류되어지며, 현재까지 크게 4개의 aspartic (carboxyl), cysteine (thiol), serine 및 metallo protease로 구분되어져 있다 (Mckerrow 1989). 이 중 cysteine protease는 많은 종에서 분리 및 특성이 보고되고 있으며, 다시 papain 및 calpain 계열로 나누어져 있고, 이미 많은 동물 및 식물류에서 분리되어 그것의 특이적인 기질 (substrate) 및 저해제 (inhibitor)가 개발되어져 있다. 현재 papain like cysteine protease는 cysteine protease class의 가장 큰 subfamily로 동물과 식물계 전체에 걸쳐 널리 나타나며, 또한 바이러스나 박테리아에서도 존재한다고 보고되었다 (Turk et al., 2000). 모든 papain-like cysteine proteases는 공통적으로 signal peptide (pre enzyme), propeptide (pro enzyme)와 catalytic domain (mature enzyme)으로 구성된다고 알려져 있다 (Sajid and Mckerrow, 2002; Turk et al., 2000). 이 중 prepro region (enzyme)의 기능은 다양하게 연구되고 있는데 먼저 catalytic domain의 단백질 folding을 위한 구조적 역할, endosomal-lysosomal compartment에 proenzyme의 transport 역할, catalytic domain의 비활성화를 위한 high-affinity reversible

inhibitor로의 역할 등을 한다고 보고하였다 (Sajid and Mckerrow, 2002; Turk et al., 2000). 현재 papain-like cysteine proteases의 catalytic domains (mature enzyme)는 아미노산 220와 260개로 구성되며, 모든 cysteine proteases는 공통적으로 cysteine, histidine과 asparagine 잔기로 이루어진 conserve한 active site를 가진다고 보고하였다 (Sajid and Mckerrow, 2002).

현재 생물체에서 다양한 cysteine protease의 중요성은 단백질 서열에 기초로 한 papain 계열로서 보고되어지며, 특이한 기질 특이성을 가진다고 보고되고 있다 (Kelley et al., 2003). 이 중 Papain 계열의 cysteine protease는 주로 cathepsins 계열로 잘 분류 되어져 있으며, 이러한 기생충들은 기생충감염에 있어서 생물학적 및 병원성 인자로서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Lecaille et al., 2002). 현재 cathepsin cysteine protease는 *Leishmania mexicana* (Robertson and Coombs, 1993), adult *Schistosoma mansoni* (Caffrey et al., 2002), *Acanthamoeba culbertsoni* (Yun et al., 1999), *Trypanosoma cruzi* (Cazzulo et al., 1989), *Paramecium tetraurelia* (Volkel et al., 1996), *Tetrahymena* spp. (Karre et al., 1993; Suzuki et al., 1998), *Plasmodium falciparum* (Rosental and Nelson, 1992) 등과 같은 다양한 기생충 종에서 보고되고 있으며, 이러한 cathepsin cysteine protease들은 중요한 기능을 가진다고 알려져 있다.

현재 기생충에서의 cathepsin cysteine protease는 생물학적 기능이 다양하게 보고되고 있으며 특히, virulence factor로서 조직/피부 침투, 숙주 조직 침입, 숙주 단백질의 파괴, 세포외기질 분해, 숙주 면역방어의 회피, 영양 섭취, hemoglobinase activity 등과 같은 다양한 기능을 가진다고 보고하였다 (Mckerrow, 1989; Sajid and Mckerrow, 2002). 따라서, 기생충의 cathepsin cysteine protease에 대한 연구는 기생

중 구제를 위한 vaccine 및 chemotherapy의 대상으로서 연구 되고 있다. 본 장에서는 앞 장에서 스쿠티카충의 다양한 항원 중에 papain 계열의 cysteine protease가 항원으로서 기능을 하리라 추정되었다. 따라서, 스쿠티카충으로부터 다양한 protease의 활성을 검색하고, 그 특성을 조사하고자 스쿠티카충의 cDNA library에서 cysteine protease의 한 계통인 cathepsin cysteine protease로 추정되는 유전자를 클로닝, 발현 및 그 생리적 기능을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 스쿠티카충의 다양한 protease의 활성 특성 검색

1.1. 스쿠티카충의 분리 및 배양

스쿠티카충의 분리는 먼저 감염된 넙치, *P. olivaceus*를 무균대 안에서 해부를 한 후, 뇌를 꺼내어 1 × Hank's buffer saline (HBSS)에 넣은 후, 30분 동안 실온에 두었다. 그런 다음 1 × HBSS를 멸균 피펫으로 E-tube에 담아 1,000 × g 3분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 미리 배양해둔 CHSE-214 주화세포 (10% FBS, 100 U streptomycin & penicillin G)에 접종하여 배양기에서 18°C, 5일 간 배양하거나 혹은 0.1% yeast extract 배지를 이용하여 실온에서 배양하였다. 배양된 스쿠티카충은 1 × HBSS를 이용하여 1000 × g, 3분 동안 3번 세척한 후, 실험에 사용하기 전까지 -75°C에 보관하였다.

1.2. Proteolytic activity 측정

Proteolytic 활성 측정은 직접법과 간접법의 방법으로 측정하였다. 직접법은 Keene 등 (1986)의 방법에 따라서 SDS-PAGE 전기영동 안에서 gelatin, BSA을 분해하는 능력으로 측정하였다. Separating gel의 조성은 0.1% gelatin을 포함하는 12% gel을 사용하였고, stacking gel은 5%를 사용하였다. 사용된 sample buffer는 substrate sample buffer [0.5 M Tris/pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue]를 사용하였으며, 샘플과 sample buffer를 1: 1로 희석한 후, 끊임 없이 well에 주입하였다. 15 mA constant current로 전기영동한 후, gel은 4°C 냉장고에서 2.5% triton X-100 용액에 침지하여 교반하였다. 이 gel은 다시 37°C 배양기에 developing buffer [50 mM Hepes/pH 7.5, 1 mM CaCl₂]에 12~18시간 배양하였다. 배양 후,

gel은 0.1% comassie brilliant blue staining을 사용하여 염색하였다. Proteolytic band는 gel의 background에 비하여 하얗게 나타난다.

간접법은 Combs (1991)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 사용된 기질은 azocasein (AZC, sigma, Co. U.S.A)을 사용하였다. 먼저, 샘플은 추출한 100 μ l cell lysate (100 μ g), 500 μ l 용액 (20 mM Hepes buffer/pH 7.0) 및 100 μ l AZC (10 mg/ml)을 섞은 후, 37°C, 2시간 배양 하였다. 이것에 0.5 ml 10% trichloroacetic acid (TCA)을 넣어서 반응을 종결시킨다. 이것을 13,000 \times g, 5분 동안 원심분리하여 상층액을 366 nm의 파장에서 흡수율을 측정하였다. 이와는 별도로 특이 기질에 대한 활성을 측정하기 위하여 N-carbobenzyloxy-arginyl-arginyl-7-amino-4-methylcoumarin (ZRR-AMC; Sigma)을 사용하여 peptidolytic 활성을 형광측정기 (fluorometric count)로 측정하였다. 측정조건은 20 mM Mes/pH 5.5, 5 mM dithiothreitol, 40 μ M ZRR-AMC, 샘플을 첨가한 전체 용량이 100 μ l 되게 하여 10분 간 37°C에서 배양한 후, 380 nm 여기 (excitation)와 460 nm 탈기 (emission)로 측정하였으며, 1 U는 37°C에서 1분 간 AMC의 NH₂-Mec (in μ mol)의 양을 일컫었다.

1.3. Protease 활성에 대한 각종 activator 및 inhibitor의 영향

Protease 활성에 대한 activator의 역할을 알아보기 위하여 먼저 cysteine protease activator로 알려져 있는 DTT 및 EDTA에 대한 활성을 알아보기 위하여 먼저 각각의 샘플, 용액, 기질 (AZC or ZRR-MCA)에 DTT (1 mM, 2 mM, 10 mM) 및 EDTA (5 mM, 10 mM)을 첨가하였다. 이들을 배양 후, 상기와 같은 방법을 사용하여 protease activity를 측정하였다. Protease 활성에 대한 각종 억제제들의 영향을 알아보기 위하여 이미 알려져 있는 aspartic 억제제인 pepstatin (50-100 μ M), 비가역적 (irreversible) cysteine 억제제인 E-64 (5-20 μ M), 비가역적 serine 억제제인 PMSF (1 mM), 및 chelating 화합물로 metallo protease 억제제인 1,10-Phenanthroline (1-2

mM)을 각각의 샘플, 완충용액, AZC (또는 ZRR-MCA)의 혼합물에 섞은 후, 배양하여 366 nm (또는 fluorescence counter)에서 흡수율을 측정하였다.

2. 스쿠티카충의 cathepsin cysteine protease 유전자들의 클로닝, 발현 및 특성

2.1. Strains, cell culture condition and plasmids

본 실험에서 스쿠티카 cysteine protease 유전자의 클로닝과 plasmid DNAs의 transformation 숙주로 사용되는 균주 (bacterial strains)와 plasmid는 National Institutes of Health (NIH; Bethesda, MD, USA)로부터 얻은 *E. coli* DH5aMCR을 사용하였다. *E. coli*는 Luria-Bertani broth (LB: 1% Bacto-tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract) 배지에 ampicillin을 첨가해 37°C, 교반 배양기에서 배양시켰다. Plasmids T vectors series (pCR 2.1 TOPO TA vector & pEZ-T vector)는 PCR 산물의 클로닝 vector로 사용하였다.

2.2. PCR products의 TA-cloning vector로의 삽입 및 *E. coli* 형질전환

PCR 반응으로 증폭된 PCR 산물은 TOPO TA-vector (Invitrogen)로 삽입되었다. 그 방법은 공급사의 권고대로 따랐으며, TOPO TA-vector 1 μ l, fresh PCR 산물 4 μ l, salt solution 1 μ l, TOPO TA-vector 1 μ l씩을 첨가하여 ligation을 실온에서 30분간 실시한 후, *E. coli*로 형질전환을 실시하였다. *E. coli* 형질전환은 calcium chloride 방법을 이용하였다. LB에 DH5aMCR을 초기 배양한 배양액 0.5 ml을 100 ml의 LB 배지에 옮겨 37°C에서 약 5×10^7 cells/ml ($OD_{600} = 0.5$)정도까지 배양하였다. 2 ml (1×10^8 cells)의 배양액을 수확하여 1.5 ml의 차가운 50 mM $CaCl_2$ -10 mM Tris 완충용액 첨가하여 수확한 세포들을 조심스럽게 풀어 얼음 속에서 1 시

간 방치한 다음 원심 분리하였고, 상층액을 제거한 후에 다시 200 μ l의 50 mM CaCl₂-10 mM Tris 완충용액 첨가하여 세포를 조심스럽게 현탁시켰다. 여기에 형질 전환 시키고자 하는 DNA를 15~20 μ l를 첨가한 뒤, 얼음 속에 50분 간 정치한 다음 42°C 항온기에서 2분 간 heat shock 시켰다. 그리고 1 ml의 LB 배지를 넣어 37°C 배양기에서 40분 동안 배양시킨 후 세포를 수확하여 적당량의 항생제가 있는 선택 평판배지에 도말하였다. 하룻밤 배양 후 생성된 white colony를 접종하여 상기의 phagemid 추출방법에 따라 plasmid를 추출하였다.

2.3. Preparedness of *E. coli* competent Cell

본 논문에서 사용된 competent cell (DH5aMCR)은 LB broth에서 배양시키고, 다시 250 ml의 SOB broth [2% tryptone powder, 0.5% yeast extract, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄]에 O.D 600 nm 값이 0.6이 될 때까지 18°C에서 배양시켰다. 배양 후 얼음에 10분간 두고, 4°C에서 10 분간 3,000 rpm으로 Spin down시켰다. 세포 침전물은 80 ml의 차가운 TB 완충용액 (10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 250 mM KCl, 15 mM CaCl₂)에 재부유되어졌고, 재희석된 세포는 얼음에 두고 다시 spin down했다. 20 ml의 세포 침전물은 다시 7% DMSO를 포함하는 차가운 TB 완충용액에 재희석되어져 얼음에 10 분간 두었다. Competent cells은 1.5 ml E-tube에 분주하고, -75°C에 보관했다. 형질전환 (transformation)할 때, competent cell은 샘플 당 약 200 μ l 사용하였다.

2.4. Preparation of DNA

*E. coli*로부터 돌연변이 (mutation)된 DNA의 추출은 AccuPrep™ Plasmid DNA extraction kit (Bioneer)를 이용하여 안내서 (manual) 방법에 따라 *E. coli*로부터 plasmid를 추출하였다. Kit를 이용하여 마지막 단계에서 증류수나 TE 완충용액으로

용출한 plasmid는 새로운 1.5 ml E-tube로 넣고 다음 실험 때까지 4℃ 혹은 -20℃에 보관하였다.

2.5. DNA sequencing

위에서 추출된 phagemid에 있는 스쿠티카충의 cDNA 염기서열을 알기 위하여 DNA sequencing을 실시하였다. DNA sequencing은 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer)와 ABI 373 automated sequencer를 사용하여 실시되었다. DNA 염기서열 정보는 M13 forward primers를 이용하여 각 clone으로부터 얻어졌으며, 얻어진 데이터는 DNAsis for Windows version 2.5 (Hitachi software engineering), Bioedit 프로그램을 이용하여 분석되어졌다. 각 clone들은 15% glycerol로 하여 -75℃에 보관하였다.

2.6. GenBank을 이용한 DNA 염기서열 분석

EST와 클로닝에 의하여 밝혀진 염기서열은 GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 통하여 유사성을 조사하였다. 유사성을 조사하기 위하여 GenBank server에서 제공하는 Blast을 이용하여 실시하였으며, BLASTX (vs. the nonredundant nucleotide library)와 BLASTN (vs. the EST sequence library dbEST) 그리고 BLASTP의 순서로 유전자 탐색을 하였으며, 그 조사 후 결과에 표시되는 P 값 등을 확인하였다. Aligned Sequence는 BioEdit 프로그램을 이용하였다.

2.7. Cathepsin B cysteine protease의 클로닝

2.7.1. PCR (Polymerase Chain reaction)과 Nested PCR.

스쿠티카충으로부터 얻어진 cDNA library에서 다양한 EST 결과들을 얻었다. 이중

EST 5-71번 clone으로부터 약 600 bp (*Blastx* 검색결과 Homo sapiens cathepsin B 와 E value: $3e^{-43}$ 의 값을 나타냄)의 cathepsin B cystine protease 유전자의 일부분을 얻었다. 이렇게 얻어진 염기서열을 바탕으로 디자인된 primer (cath 5'-1, 2)와 pBluescript SK (+) (Stratagene) vector specific primer인 reverse primer, T3 primer를 이용하여 Nested PCR 방법으로 5' 방향으로 race PCR을 실시하였다. Race PCR로 얻어진 약 250 bp cathepsin B의 clone은 염기서열을 바탕으로 하여 다시 primer를 디자인 (cath 5'-3, 4)하여 pBluescript SK (+) (Stratagene) vector specific primer (Table 3.1)를 이용하여 Nested PCR 방법으로 5' 방향으로 2번째 race PCR을 실시하였으며, 약 600 bp의 clone을 얻어 완전한 cathepsin B cystine protease 유전자를 클로닝하였다 (Fig. 3.1).

2.7.2. 첫번째 5'-race PCR

1차 PCR의 주형 (template)은 스쿠티카충의 cDNA library를 사용하였고, cath 5'-1과 reverse primer를 사용하여 pre-heating 단계는 94°C 5분, denature 단계는 94°C 30초, annealing 단계는 53°C 30초, extension 단계는 72°C 1분으로 하여 총 35 cycle을 실시하였으며, 마지막으로 post-extension 단계로 72°C 7분의 조건으로 1차 PCR을 실시하였다. 그리고 2차 PCR은 1차 PCR 산물을 주형으로 사용하고 cath 5'-2와 T3 primer를 이용하여 PCR 조건은 annealing 단계에서 64°C 30초로 하였고 나머지 조건은 1차 PCR 조건과 동일하다.

2.7.3. 두번째 5'-race PCR

1차 PCR의 주형은 스쿠티카충의 cDNA library를 사용하였고 cath 5'-3과 reverse primer를 사용하여 pre-heating 단계는 94°C 5분, denature 단계는 94°C 30초, annealing 단계는 50°C 30초, extension 단계는 72°C 1분으로 하여 총 25 cycle을 실

시한 후 denature 단계는 94℃ 30초, annealing 단계는 55℃ 30초, extension 단계는 72℃ 1분으로 10 cycle을 실시하였다. 마지막으로 post-extension 단계로 72℃ 7분의 조건으로 1차 PCR을 실시하였다. 그리고 2차 PCR은 1차 PCR 산물을 주형으로 사용하고 cath 5'-4와 T3 primer를 이용하여 PCR 조건은 annealing 단계에서 64℃ 30초로 하였고 나머지 조건은 1차 PCR 조건과 동일하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물들은 pEZ-T vector (RNA)에 삽입하였고, *E.coli* (DH5aMCR)에 형질전환 되었다. 형질 전환된 *E. coli* colony들은 다시 ampicillin을 함유한 액체배지에 접종되어 하룻밤 동안 배양되었으며, 배양된 세포들은 plasmid들을 추출하기 위하여 이용되었다. 추출된 plasmid들은 그 삽입된 DNA 염기서열들을 확인하기 위하여 DNA sequencing을 실시하였다.

Table 3.1. PCR primer sequences in this study.

	Designation	Sequence	Location
Common	M13 reverse primer	GGAAACAGCTATGACCATG	vector specific primer
	T3 primer	AATTAACCCTCACTAAAGGG	vector specific primer
	T7 primer	GTAATACGACTCACTATAGGGC	vector specific primer
	M13-20 primer	GTAACACGACGGCCAGT	vector specific primer
Cathepsin B	Cath 5-1	GCTATTGTAAGCTCCAGAAG	869-888
	Cath 5-2	GCAGTGGTGGATCCGTATTG	814-833
	Cath 5-3	AGAGTAGGGTTGACATTCAG	602-621
	Cath 5-4	CGTAATAGTTCAGGCTCCG	525-544
Cathepsin L	Cys-F1 primer	CTTACGGATGTGACGGAGGAT	862-882
	Cys-F2 primer	GCTCAGCTTCTCTGAGTAATAAC	818-840
	Cys-Full-F1primer	CCTTAGCCGGAACATCTCTC	361-380
	Cys-Full-R1 primer	AAATAAATAACTGTGTGATGAAT	1434-1456

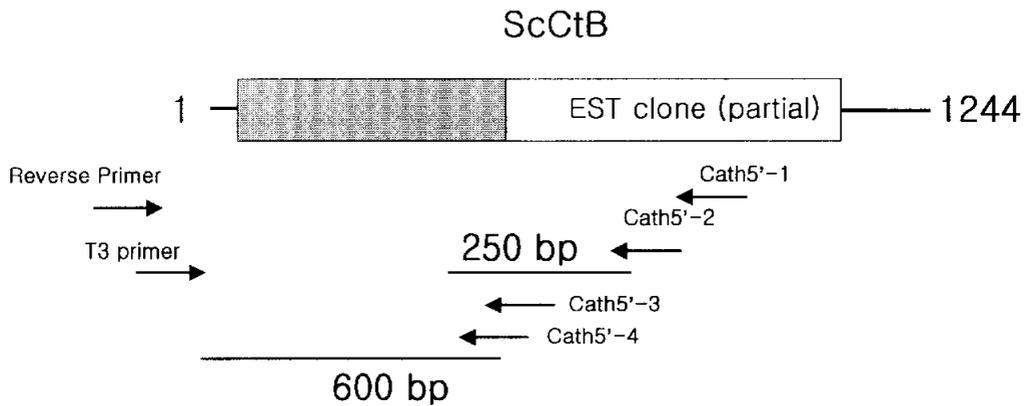


Fig. 3.1. Diagram showing the experiments of cathepsin B cysteine protease cloning isolated from scuticociliate, *U. marinum*. The horizontal bars represent the open reading frame. Dark shade and white areas indicating 5' cDNA and EST clone, respectively. The tick line extending from the bars represent both 5'-and 3'-noncoding regions. Reverse primer and T3 primer are pBluescript SK (+) (Stratagene) vector specific primer.

2.8. Cathepsin L cysteine protease의 클로닝

2.8.1. PCR (Polymerase Chain reaction) process

다른 종에서의 cysteine protease 유전자를 BLAST를 이용하여 검색한 결과 *T. thermophila*, *T. pyriformis*, *P. tetraurelia* 그리고 rat (*Rattus norvegicus*)에서의 cysteine protease 유전자가 검색되었으며, 이들 종으로부터 얻은 염기서열을 서로 alignment 한 결과 다음 Table 3.2와 같이 잘 보존된 염기서열이 2 부위에서 존재함을 확인하였다. 이 부위의 아미노산 서열은 각각 CGSCWAF와 SEQDLVDC 였으며, 특히 이 부위를 Blastp로 검색한 결과 여러 종에서 분리된 cysteine protease 단백질 서열 중에서 가장 잘 보존된 motif임을 확인하였다. 이 자료를 바탕으로 하여 그 부위에 해당하는 degenerated primer를 각각 디자인하였으며, 그 각각을 Cys_pro-For1과

Cys_pro-For2로 명명하였다. 클로닝을 위한 PCR (Polymerase chain reaction)반응은 스쿠티카 cDNA libraries로부터 각 목표 DNA에 있는 18~25 mer의 앞의 primer 조합을 사용하였다. PCR cycle은 1차 PCR (Cys_pro-For1 primer와 M13-20 primer의 primer set)은 pre-heating 단계는 94℃ 5분, denature 단계는 94℃ 30초, annealing 단계는 45℃ 40초, extension 단계는 72℃ 1분으로 하여 총 35 cycle을 실시하였으며, 마지막으로 post-extension 단계로 72℃ 10분의 조건으로 1차 PCR을 실시하였다. 그리고 2차 PCR (Cys_pro-For2와 T7 primer를 primer set)은 1차 PCR 조건과 거의 동일하며, 단지 annealing 단계에서 50℃ 30초로 PCR을 실시하였다. 1, 2차 PCR 결과 그 PCR 산물이 예상하는 DNA 크기와 vector 일부를 포함하는 약 730 bp임을 전기영동으로 확인하였으며, 이것의 DNA sequencing을 실시하였다. 얻어진 730 bp 염기서열을 Blastx로 확인한 결과 여러 종의 cysteine protease 단백질과 유사성이 있음을 확인하였다. 특히, *Astragalus sinicus* 종의 cysteine protease 단백질과 매우 유사성이 높은 결과를 얻었으며, 이때 Blastp의 E값은 $2e^{-36}$ 을 보였다. 이 확인된 스쿠티카종 cysteine protease의 일부 DNA 서열 (730 bp)을 바탕으로 하여 아직 밝혀지지 않은 5'쪽의 염기서열을 확인하기 위하여 Cys-F1 primer, M13 reverse primer 그리고 Cys-F2 primer, T3 primer set들을 조합 (Table 3.1)으로 하여 클로닝을 수행하였다. PCR 조건은 초기 cysteine protease 일부 DNA 서열 (730 bp)을 얻을 때와 거의 유사하며, 단지 annealing 단계에 있어 1차 PCR은 50℃ 30초와 2차 PCR에서 55℃ 30초로 실시하였고, Invitrogen사의 GeneRacer™ kit를 이용해 5' Gene Race를 실시하였다.

Table 3.2. Design to construction of Cys_pro-For1 and Cys_pro-For2 primer.

Organism	Nucleotide sequences						
	C	G	S	C	W	A	F
<i>T. thermophila</i>	TGT	GGT	TCA	TGC	TGG	AGT	TT
<i>T. pyriformis</i>	TGC	GGT	TCT	TGC	TGG	GCT	TT
<i>P. tetraurelia</i>	TGC	GGT	GCA	TGC	TGG	GCC	TT
<i>R. norvegicus</i>	TGT	GGT	TCT	TGC	TGG	GGC	TT
Cys_pro-For1 primer	TGY	GGT	KCW	TGC	TGG	RSY	TT

Organism	Nucleotide sequences							
	S	E	Q	D	L	V	D	C
<i>T. thermophila</i>	TCT	GAG	TAA	TAA	CTT	GTT	GAT	TG
<i>T. pyriformis</i>	TCT	GAA	CAA	CAA	CTC	GTT	GAT	TG
<i>P. tetraurelia</i>	TCT	GAA	TAA	GAT	TTG	GTT	GAC	TG
<i>R. norvegicus</i>	AGT	GAA	CAG	AAC	CTT	GTG	GAC	TG
Cys_pro-For2 primer	TCT	GAR	YAA	BAW	YTB	GTT	GAY	TG

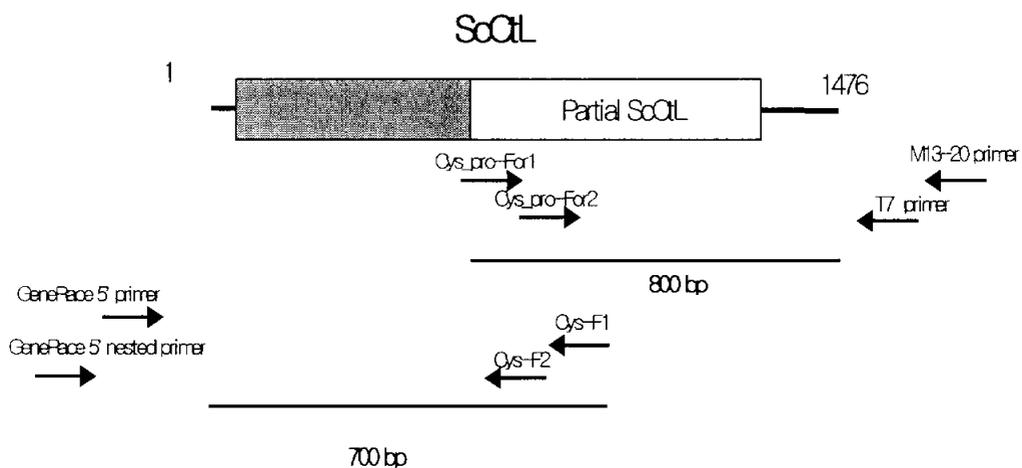


Fig. 3.2. Diagram showing the experiments of cathepsin L cysteine protease cloning isolated from scuticociliate, *U. marinum*.

2.8.2. 5' Gene Race

스쿠티카 cysteine protease 유전자의 Full-length cDNA의 클로닝을 위해 Invitrogen사의 GeneRacer™ kit를 이용했다. total RNA의 추출을 위한 스쿠티카충은 상기의 안내서의 방법으로 얻었다. 이는 5×10^6 세균을 이용시 최종적으로 100 μ l의 Nuclease-Free 물을 넣어 용출한 후, -75°C에서 보관하였다. Kit 매뉴얼의 방법에 따라 CIP reaction (Dephosphorylation RNA), TAP reaction (Removing the mRNA Cap structure), Ligation reaction (Ligating the RNA Oligo to Decapped mRNA) 뒤 RT - PCR (Reverse - Transcribing mRNA)을 수행하였다. 이 후, 5' nested Primer (5'-GTAGACTAGGTTGTGATTTTATTTCCA-3')와 5' RACE GSP (5'- CCTAAAGTGAAAGAGTTATTTGCGTTA-3')를 이용해 Touch down PCR, Nested PCR을 수행해 얻어진 클론을 ligation 후, TOPO vector에 넣어 클로닝하였다.

2.8.3. 위치 특이 유전자 변이 (Site-directed Mutagenesis)

Site-directed mutagenesis는 특정 DNA 염기서열을 변화시킴을 의미하며, 어떤 단백질의 기능부위를 연구할 때에 의심되는 부위의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환 혹은 제거한 다음 기능의 변화를 관찰함으로써 기능부위를 규명할 수 있다. 더불어, DNA 재결합시 필요한 제한효소 절단부위를 만들거나 소실시킬 때 사용되기도 하며, promoter나 enhancer 연구에서 어떤 transacting factor가 결합하여 어떤 기능을 하는지를 알기 위하여 그 결합 부위의 염기서열을 변화 시켜서 결합을 못하게 한 다음 promoter나 enhancer의 활성을 측정함으로써 그 transacting factor의 중요성을 조사하는데 이용되기도 한다. Site-directed mutagenesis는 여러 가지 방법이 개발되어 소개되었는데, 본 논문에서는 PCR을 이용한 site-directed mutagenesis를 이용해 스쿠티카충 번역 (translation)을 위한 염기서열에서 TAA와 TAG는 glutamine (Q)으로 번역되지만, *E. coli*에서는 종결코돈으로 인식해 이 TAA와 TAG

를 각각 CAA와 CAG로 변환하기 위하여 megaprimer PCR을 이용한 site-directed mutation법을 이용하여 point mutation을 실시했다. PCR을 이용한 site-directed mutation법은 다음과 같으며 (Fig. 3.3), 사용된 primer는 Table 3.3에서 나타내었다.

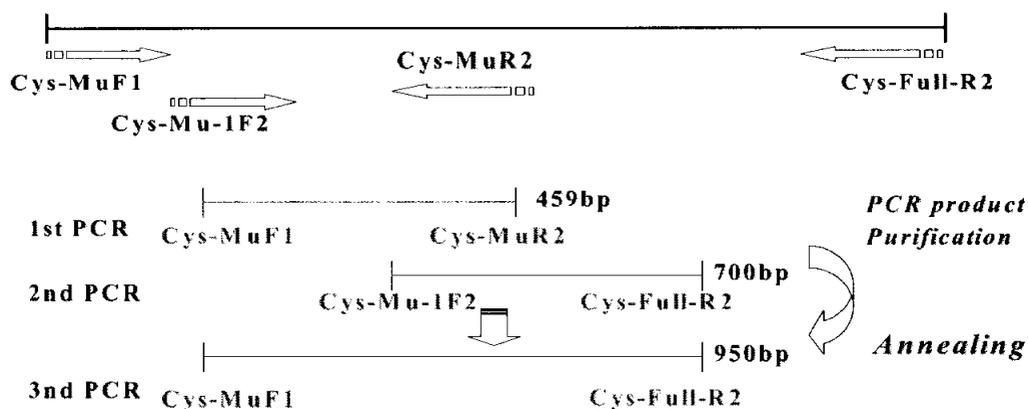


Fig. 3.3. Diagram showing of PCR-based site-directed mutagenesis.

Table 3.3. Specific primer to CR-based site-directed mutagenesis.

Designation	Sequence	Location
Cys-Eco-1F	CGGAAAATTCAAAGAATGGAAACAAAATC	425-453
Cys-Eco-2F	TATAGATTCCAAGTTTATTTTGA	486-508
Cys-Eco-1R	TTCGACAAATTGGAAATTTTC	507-527
Cys-Eco-2R	CATGGCAGCGAATTGATTTTCAAC	561-584
Cys-Mu-1F	CAAGTTGACAGAAATGTITA	648-667
Cys-Mu-1F2	AATTATCAACAAGTTGACAGA	639-659
Cys-Mu-ER	AGTAAATTGGGCTTTGAATTC	594-614
Cys-MuR1	GTTGTTGCTCAGAGAAGCTGAGC	818-840
Cys-MuR2	GAAACAAGTTGTTGCTCAGAGA	826-847
Cys-Full-R2	TCAAATTTATCAGTTAGTGG	1318-1337

2.9. *E. coli* (BL 21 DE3)에서 재조합 단백질의 발현

2.9.1. Cathepsin B cysteine protease의 부분 발현

섬모충의 macronuclear translation시에 TAA와 TAG부위는 glutamine (Q)으로 번역되나, *E. coli* system에서 발현시에는 종결코돈으로 인식되어진다. 따라서, 대장균에서 종결 코돈으로 사용되는 TAA부위가 없는 C-terminal 부위의 96개 아미노산 (Fig. 3.6)을 *E. coli* (BL21 DE3) 에서 발현 시켰다. pET-28a 발현 vector의 *EcoR I* 과 *Xho I* site를 이용하여 원하는 유전자를 삽입시키기 위하여 5'부분에 *EcoR I* 과 *Xho I* site를 첨가한 primer를 제작하였다 (Forward primer; AAGAATTTCATCAAAGCCGAAATT TAC, Reverse primer; AACTCGAGTTATTGTTGTCCTGGGACAAATC). 주형은 스쿠티카충의 EST 5-71번 clone을 사용하였고 forward primer와 reverse primer를 사용하여 pre-heating 단계는 94°C 5분, denature 단계는 94°C 30초, annealing 단계는 60°C 30초, extension 단계는 72°C 1분으로 하여 총 35 cycle을 실시한 후 마지막으로 post-extension 단계로 72°C 7분의 조건으로 1차 PCR을 실시하였다. PCR 산물과 pET-28a vector를 *Xho I* 로 3시간 반응 후 정제하여 다시 *EcoR I* 으로 3시간 반응 후 정제하였다. 이렇게 제한효소로 처리 후 정제된 PCR 산물과 vector는 T4 ligase로 ligation 후 *E. coli* (DH5a)에서 형질 전환하여 plasmid를 추출하여 삽입된 DNA를 확인하고, 확인된 유전자를 다시 *E. coli* (BL21 DE3)에 형질 전환시켜 다시 plasmid를 추출하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열이 확인된 clone을 얻어 kanamycin을 첨가한 LB배지에 $O \cdot D_{600} = 0.5$ 일 때 마지막 농도가 0.4 mM이 되게 IPTG를 첨가하여 3 시간 배양 후, 원심분리하여 세포를 얻었다. 얻어진 *E. coli*는 파쇄하여 SDS-PAGE와 Western blotting을 수행하였다.

2.9.2. cathepsin B polyclonal antibody 제작

토끼에 대한 다클론 항체를 제작하기 위하여 재조합된 단백질 (recombinant

cathepsin B partial protease)은 미리 순치된 토끼에 FCA (Freund's complete adjuvant)와 단백질을 유화시킨 후 피하주사하였다. 두 번째부터는 FIA (Freund's incomplete adjuvant)와 불화화시킨 단백질을 유화시킨 후 피하주사하였다. 이와 같은 방법으로 2주 간격으로 세번 더 피하 주사하였다. 마지막 boosting 후, 1 주일이 흐른 후에 토끼의 심장에서부터 채혈한 후, 상온에서 2시간 나둔 후, 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 항혈청은 0.02% sodium azide를 첨가시킨 후, -75°C에서 보관하거나, protein A 칼럼을 이용하여 IgG만을 분리하여 실험에 사용하였다.

2.9.3. Cathepsin L protease의 발현

재조합 cathepsin L protease를 만들기 위하여 pGEX 발현 vector를 이용하여 *E. coli* (BL21 DE3)에서 발현시켰다. 이를 위하여 cathepsin L cysteine protease의 full sequence 중에서 proenzyme이 포함된 부위를 subcloning하였다. 이것을 다시 pGEX 발현 vector의 *BamH I* 과 *Xho I* site를 이용하여 원하는 유전자를 삽입시키기 위하여 5'부분에 *BamH I* 과 *Xho I* site를 첨가한 primer를 제작하였다 (Forward primer; GCCGGATCCACCTCTTTAGAAGCTACT, Reverse primer; GCGCTCGAGTCAGTTA GTGGGAT). 주형은 site-directed mutagenesis하여 최종적으로 얻어진 clone을 사용하였고, forward primer와 reverse primer를 사용하여 pre-heating 단계는 94°C 5분, denature 단계는 94°C 30초, annealing 단계는 60°C 30초, extension 단계는 72°C 1분으로 하여 총 35 cycle을 실시한 후 마지막으로 post-extension 단계로 72°C 7분의 조건으로 1차 PCR을 실시하였다. PCR 산물과 pGEX vector를 *Xho I* 및 *BamH I* 으로 각각 3시간 반응 후 정제하였다. 이렇게 제한효소로 처리 후 정제된 PCR 산물과 vector는 T4 ligase로 ligation 후 *E. coli* (DH5a)에서 형질 전환하여 plasmid를 추출하여 삽입된 DNA를 확인하고, 확인된 유전자를 다시 *E. coli* (BL21 DE3)에 형질 전환시켜 다시 plasmid를 추출하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열이 확인된 clone을

얻어 ampicilin이 첨가된 LB배지에 $O \cdot D_{600} = 0.5$ 일 때 마지막 농도가 0.4 mM이 되
게 IPTG를 첨가하여 3시간 배양 후, 원심 분리하여 *E. coli* 세포를 얻었다. 얻어진 *E.*
coli 는 파쇄하여 SDS-PAGE을 수행하였다.

3. 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease의 정제 및 기능분석

3.1. 스쿠티카충의 protease의 분리 및 정제

스쿠티카충을 homogenizing buffer (20 mM HEPES/pH 7.0)으로 녹인 후, 초음파기 (Branson, Co. USA)를 이용하여 40%, 30초 동안 3회 파쇄하였다. 파쇄한 것은 다시 $100,000 \times g$, 1시간 동안, 4°C에서 초원심분리하여 그 상층액을 0.22 μ m syringe filter를 사용하여 걸러내었다. 전처리 된 샘플은 20 mM Tris/pH 7.0으로 평형화된 preparative TSKgel DEAE 칼럼 (21.5 mm \times 15 cm, TOSOHAS)을 이용한 HPLC (Hellet Packard. HP1100)로 분리하였으며, 유속은 3 ml/min, 1 M NaCl로 60분 동안 0.4 M로 linear gradient 로 용출하고 60분에서 80분 까지 1 M NaCl이 되게 용출하였다. 용출되어진 각 샘플은 fraction collector (Gilson. Co. France)로 1 tube/min로 모았다. 각각의 모아진 샘플은 위의 proteolytic assay를 실시하였다. 각 분획물은 상기와 같은 방법을 통하여 proteolytic 활성을 측정하였으며, 다양한 항체 하에서 western blotting을 수행하였다.

3.2. 각종 어류 주화세포주에 대한 정제된 단백질의 병원성 측정

병원성 측정을 위한 어류주화세포는 CHSE-214 cell line이었으며, 본 실험실의 배양기에서 순치를 시켰다. 상기의 어류 주화세포 배양 조건은 MEM 배지 (10% FBS, 100 U streptomycin & penicillin G), 20°C에서 세포의 수가 10^6 /ml이 되게 75 T plask에서 세포를 자라게 한 후, 6 well plate (Corning)에서 다시 계대배양하였다. 계대배양하여 자란 세포는 부분 정제된 MEM으로 세척 후, FBS가 없는 배지에 ScCt B 샘플을 농도별로 넣은 후, 20°C의 배양기에서 24시간, 48시간 동안 세포의 cytotoxicity를 측정하였다.

3.3. 혈구세포에 대한 hemolysis 활성 측정

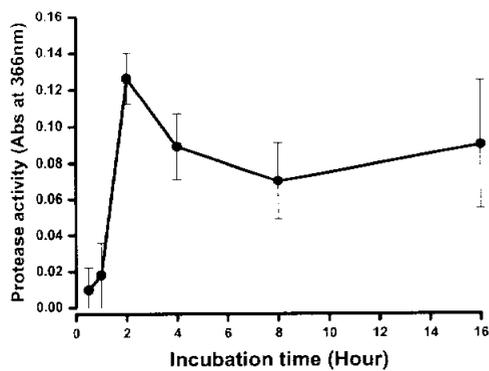
분리한 protease 샘플의 hemolysis 활성을 측정하기 위하여 우선, 실험동물로부터 buffy coat를 원심분리에 의해 제거하여 혈구를 얻었다. 얻어진 혈구는 tris 완충용액 (10 mM Tris/pH 7.4, 150 mM NaCl)로 3번 씻은 후 4℃에 저장하였다. 이것의 세포 수는 10^5 cell/ml로 맞춘 후, 샘플과 37℃에서 1시간 배양하였다. 배양된 혈구세포는 원심분리하여, 상층액을 540 nm에서 측정하였다. 대조구로서는 샘플을 처리하지 않은 적혈구를, 그리고 100% 표준으로서는 1% Triton X-100을 처리한 적혈구의 상층액의 흡광도를 측정하여 사용하였다.

III. 결 과

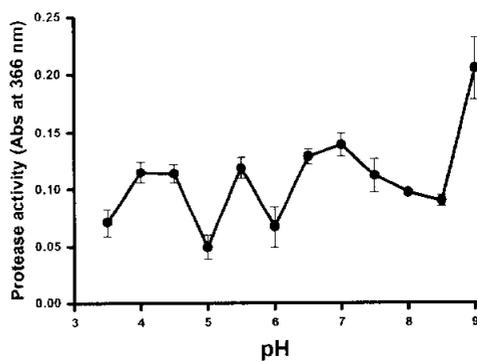
1. 스키타카충의 다양한 protease의 활성 특성 검색

스쿠틀카충으로부터 분리한 물질의 azocasein 기질에 대한 protease activity 측정하기 위하여 배양 시간에 대한 영향을 측정하였다. 배양시간이 지남에 따라 활성은 증가하나 2시간째에 가장 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 3.4). 또한, 시간이 지날수록 protease 활성이 감소됨을 알 수 있었다. pH에 대한 영향을 확인하기 위하여 배양시간 및 온도를 2시간 및 37°C로 고정한 후, 이러한 상태하에서 crude한 물질에 있어 protease 활성은 pH 4-4.5, pH 5.5, pH 7, pH 9 정도의 범위내에서 크게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3.4). 또한, 가장 높은 활성은 pH 9에서 나타났으나, 표준편차가 매우 심하게 나타남을 알 수 있었다. 이러한 것으로 미루어 보아 스키타카충에는 적어도 acidic protease, neutral protease, basic protease가 존재하는 것으로 관찰되어진다. 스키타카충으로부터 분리한 물질의 온도에 대한 영향을 확인하였다. 이때의 protease activity 분석 조건은 MES buffer (pH 5.5) 및 배양시간은 2시간, 온도 변화를 주기 위해 각각의 항온기는 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C로 설정하였다. crude 물질의 온도에 대한 protease activity는 37°C에서 최고로 높게 나타났다 (Fig. 3.4).

A



B



C

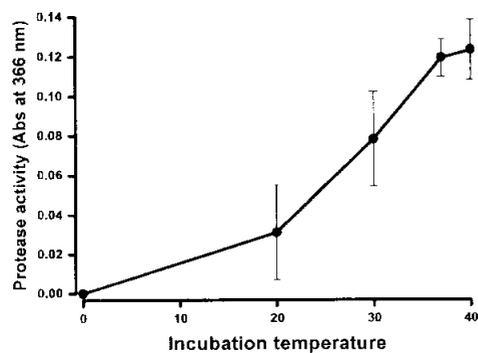


Fig. 3.4. Effects of incubation time (A), pH (B), temperature (C) on proteolytic activities of scuticociliate extracts. The buffers were used 20 mM MES buffer (pH 5.5). Each point is mean \pm standard deviation from 4 independent determinations.

2. 스키타카충의 cathepsin cysteine protease 유전자들의 클로닝 서열 특성 분석 및 발현

2.1. 스키타카충의 cathepsin B cysteine protease의 클로닝

DNA sequencing 등을 통하여 스키타카충으로부터 클로닝한 cathepsin B cysteine protease는 1,244 bp이며, 이중 1,053 bp의 origin reading frame (ORF) 와 33 bp의 5'-untranslation region 부분과 158 bp의 3'-untranslation region 부분으로 이루어져 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3.5). Cathepsin B cysteine protease는 총 350개 아미노산으로 이루어진 preproprotein으로 구성되어 있다. 이들은 17개의 signal peptide로 추정되는 아미노산부위인 preenzyme 부위, 68개의 아미노산으로 구성된 proenzyme 부위, 그리고 265개의 아미노산으로 이루어진 mature enzyme 부위로 구성되어 있다 (Fig. 3.5). 이중 생체내에서 cathepsin B cysteine protease의 역할을 하는 mature enzyme의 분자량은 29,218 Da이며, 일반적인 cathepsin B cysteine protease의 분자량을 알 수 있었다.

2.2. 스키타카충의 cathepsin B cysteine protease 유전자의 특성 분석

완전 클로닝한 cathepsin B cysteine protease는 다양한 소프트웨어를 이용하여 분석을 하였다. 먼저 cathepsin B-like cysteine proteases의 대표적인 특징은 conserve한 Pro-Tyr¹⁰³ motif와 Cys¹²⁸ (cathepsin B numbering)사이의 occluding loop의 삽입이다. 이러한 loop는 두 인접한 cathepsin B의 depeptidyl carboxypeptidase 활성을 책임지는 히스티딘 잔기들 (His¹¹⁰, His¹¹¹)로 특징지어진다고 보고되었다 (Musil et al., 1991). 이를 바탕으로 하여 Blast에서 검색한 다양한 종의 cathepsin B cysteine protease와 스키타카충의 cathepsin B cysteine protease의 아미노산 alignment를 실시하였다 (Fig. 3.6). Alignment에서 보는 바와 같이 cathepsin B cysteine protease의

특이적인 signal peptide cleavage site로 추정되는 'GNFD' motif를 proenzyme region에 보존되어져 있음을 알 수 있었다. 더불어, Blastp 검색결과 사람과 57%의 가장 높은 유사성을 보였다. 그리고 endopeptidase의 기능을 나타내는 Cys 29, His 209, Asn 229가 잘 보존되어 있으며, exopeptidase의 기능을 나타내는 occluding loop의 His 117, 118도 잘 보존되어 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3.6).

2.3. 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease의 부분발현 및 항체제작

Fig. 3.5에서 얻어진 스쿠티카충 cathepsin B cysteine protease의 full sequence 중에서 종결 codon이 없는 C-terminal 부위의 96개 아미노산을 *E.coli* (BL21 DE3)에서 발현 시켰다. 세포를 3시간 배양 후, IPTG를 이용하여 induction 하여 다시 3시간 배양시켰다. 세포를 모아서 1 × sample buffer에 녹인 후, 10분 간 끓였다. 이것을 SDS-PAGE와 western blotting으로 분석하였다 (Fig. 3.7). 분석한 결과 cathepsin B cysteine protease의 일부분으로 확인된 band를 도끼에 피하주사하여 cathepsin B cysteine protease에 대한 다클론 항체를 제작하였다.

2.4. 스쿠티카충의 cathepsin L cysteine protease 유전자의 클로닝

DNA sequencing 등을 통하여 스쿠티카충으로부터 클로닝한 cathepsin L cysteine protease는 1,476 bp이며, 이중 999 bp의 origin reading frame (ORF) 와 326 bp의 5'-untranslation region 부분과 151 bp의 3'-untranslation region 부분으로 이루어져 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3.8). Cathepsin L cysteine protease는 총 333개 아미노산으로 이루어진 preproprotein으로 구성되어져 있으며, 이들은 25개의 signal peptide 로 추정되는 아미노산부위인 preenzyme 부위, 93개의 아미노산으로 구성된 proenzyme부위, 그리고 215개의 아미노산으로 이루어진 mature enzyme 부위로 구성되어져 있다 (Fig. 3.8). 이중 생체내에서 cathepsin L cysteine protease의 역할을

하는 mature enzyme의 분자량은 24 kDa이며, 일반적인 cathepsin L cysteine protease의 분자량임을 알 수 있었다.

2.5. 스쿠티카충의 cathepsin L cysteine protease 유전자 서열 특성분석

완전 클로닝한 cathepsin L cysteine protease는 다양한 소프트웨어를 이용하여 분석을 하였다. 모든 papain-like cysteine proteases는 공통적으로 signal peptide, propeptide와 catalytic (mature) domain으로 구성된다고 보고되며, cathepsin L-like cysteine protease [cathepsin S와 cathepsin K를 포함]는 proregion내에 conserve한 inter-spaced motif인 'ERFNIN (Glu, X₃, Arg, X₂, (Ile/Val), Phe, X₂, Asn, X₃, Ile, X₃, Asn)'을 가진다고 알려져 있다. 본 실험에서 얻은 스쿠티카충의 cathepsin L cysteine protease 유전자를 다양한 종의 cathepsin L 유전자와 alignment 하였을시에 특징적인 'ERFNIN', 'NSW' motif를 가짐을 알 수 있었다 (Fig. 3.9).

2.6. 스쿠티카충의 cathepsin L cysteine protease 유전자의 발현

스쿠티카 cathepsin L cysteine protease 유전자의 promature 부위 (308 아미노산)와 partial 부위 (100 아미노산)를 GST fusion된 pGEX vector에 각각 삽입하여 0.4 mM IPTG로 발현시켰을시에 대략 60 kDa와 32 kDa가 각각 발현됨을 알 수 있었다 (Fig. 3.10).

shown in bold faces. Poly (A) tail is thick underline. The gray box in the amino sequence indicate the putative signal peptide and propeptides of cathepsin B, respectively. The active site cysteine, histidine and asparagine residues are revealed. The italic underline is partial expression region.

G N

ScCtB ----MYKQ- -----ILLIA LIVASVQA-- FDFKLFSTSEI MEEVNNYNTG STWKAGY~~N~~KR 47
 TcCtB --MRVYPSLS IALFI-FLLYA TACHSFHA-- EDAPITDEF LELVNRLN-G GKWTAG---R 52
 DrCtB -----MWRL- ---AFLCVIS ALSVSWAR-- PRLAPLSHEM VNFINKA--N TTWTAG---- 43
 SmCtB -----MITS I CIASLITFL EAHISVKN-- EKFEPLSDDI ISYINEHP-N AGWRAEK--S 50
 LmCtB MAFRTKSALC LVAVFVLLA TTVSALYAKP SDIPLLKGSF VAETNSKA-K GQWTAS---A 56
 HsCtB -----MWQLW ---ASLCCLL VIANARSR-- PSFHPLSDEL VNYVNKR--N TTWQAG---- 44

F D

ScCtB ~~F~~E~~G~~M~~S~~F~~D~~QIQ AMMGTIATPV HMIPDERYTP FETIQN---L SLPESFDLRE AYPKCESLQQ 104
 TcCtB TSRTKYLTR- -RGASRLGT FLRNTSILPP RQFSEELRV PLQDRFDAGE AWPKCPTITE 110
 DrCtB ---HNFRDVD YSYVKRLCGT FLKGPKLPVM VQYTEG---L KLPKNFDARE QWPNCPTLKE 97
 SmCtB NREHSLDDAR IQMGARKEEP DLRRTRRPTV DHNDWN---V EIPSSFDSRK KWPRCKSIAT 107
 LmCtB DNGHLVTGKS LEEVRKLMGV TSMSTEAVPP RNFSVEEMQQ DLPESFDASE KWPMCVTIGE 116
 HsCtB ---HNFYNDV MSYLKRLCGT FLGGPKPPQR VMFTED---L KLPASFDARE QWPQCPTIKE 98

ScCtB VRDQSNCGSC WAFGTVEAIS DRICIASGQK DQTRISSENL LSCCRGTFAC GMGCNGGYTA 164
 TcCtB IRDQSSCGSC WAVAAASAMS DRYCTLGGVR -DLRISAGDL MSCCDV---C GYGCNGGYPE 166
 DrCtB IRDQSGCGSC WAFGAEEAIS DRVCIQSNK VSVEISSQDL LTCCDS---C GMGCNGGYPS 154
 SmCtB IRDQSRGCGSC WAFGAVEAMS DRSCIQSGGK QNVELSAVDL LSCEES---C GLGCEGGILG 164
 LmCtB IRDQSNCGSC WAIAAVEAMS DRYCTMSGIP -DRRISTTNL LSCCFI---C GFGCYGGIPA 172
 HsCtB IRDQSGCGSC WAFGAVEAIS DRICHTNAH VSVEVSAEDL LTCCGSM--C GDGCNGGYPA 156

ScCtB GAWNYVKTG LVSGNLYTDD NQNSKTECQP YSFPPCSHHV QGE-YQACTD LPQFNTPKCY 223
 TcCtB VAWEYYAVHG IVS----- --EY---CQP YPFPSCAHHV NSSDLSPCSG --EYDTPTCN 212
 DrCtB AAWDFWTTDG LVTGGLY--- --NSHIGCRP YTIEPCEHHV NGS-RPPCTG E-GGDTPNCD 207
 SmCtB PAWDYVWKEG IVTGSSK--- --ENHTGCEP YFPKCEHHT KKG-YPPCGS K-IYKTPRCK 217
 LmCtB MAWLWVWVVG VTT----- --EL---CQP YPFGPCSHHG NSSKYPPCPN T-IYNTPKCN 219
 HsCtB EAWNFWTRKG LVSGGLY--- --ESHVGRCP YSIPPCEHHV NGS-RPPCTG E-G-DTPKCS 208

ScCtB TECNSQYTN SYEQDLHKGV SSVSVPKSEE QIKAEIYQYG STASFNVS DFLTYSSGVY 283
 TcCtB STCTDKKIP- ---LIKYRGN TSYILS-GEE SFKRELLNG PFEVSFSVYA DFBVAYTGGVY 267
 DrCtB MKCEPGYSP- LYKEDKHFGK TSYSVPSNQN GIMAE~~L~~FKNG PVEAAFTVYE DFLLYKSGVY 266
 SmCtB QTCQKKYKT- PYTQDKHRGK SSVNVKNDK AIQKEIMKYG PVEAGFTVYE DFLNYKSGIY 276
 LmCtB TTCDNVEME- ---LVKYKGV SSVS~~I~~K-GER ELDHELMNNG PLEVAMQVYA DFBVAYKSGVY 274
 HsCtB KICEPGYSP- TYKQDKHYG NSYSVSNSEK DIMAEIYKNG PVEGAFSVYS DFLLYKSGVY 267

ScCtB QNTSGSYMGG HAIKMLGWGV ENGTPYLCA NSWNSSWGEN GFFKILRGSN ECGIESGMVA 343
 TcCtB KHVTGVFLGG HAVRIVGWGE LN~~G~~EPYWKIA NSWNHEWGMN GYFLIARGVD ECGIEGSGVA 327
 DrCtB QHMSGALGG HAIKILWGE ENGVPYLAA NSWNTDWGDN GYFKILRGED HCGIESEIVA 326
 SmCtB KHITGETLGG HAIRIIGWV ENKTPYLIA NSWNEDWGEN GYFRIVRGRD ECSIESEVTA 336
 LmCtB KHVSGDHLGG HAVKLVGWGV KDGIPYWKIA NSWNTDWGDK GYFLIQRGND ECGIESSGVA 334

HsCtB QHVTGEMMGG HAIRILGWGV ENGTPYWLVA NSWNTDWGDN GFFKILRGQD HCGIESEVVA 327

ScCtB GFVPGQQ--- -- 350

TcCtB GIPRIP----- -- 333

DrCtB GIPM----- -- 330

SmCtB GRIN----- -- 340

LmCtB GKPGEE----- -- 340

HsCtB GIPRTDQYWE KI 339

Fig. 3.6. Comparison of the deduced amino acid sequence of ScCtB and other cathepsin B or cathepsin B-like protease. Abbreviation are : HsCtB, *Homo sapiens* cathepsin B (AAP36125); DrCtB, *Danio rerio* cathepsin B (AAH44517); LmCtB, *Leishmania mexicana* cathepsin B (CAA88490); SmCtB, *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 (CAD44624); TcCtB, *Trypanosoma cruzi* cathepsin B-like (AAD03404); ScCtB, Scuticociliate cathepsin B (AY450954). A vertical arrow indicates the putative signal peptide cleavage site. (Martoglio and Dobberstein 1998; Nielsen et al., 1997) The conserved 'GNFD' motif is shown in the bold face and italic type. (Vemt et al., 1995). Cysteine residues shown to form disulfide bridge in ScCtB are indicated by closed circle.

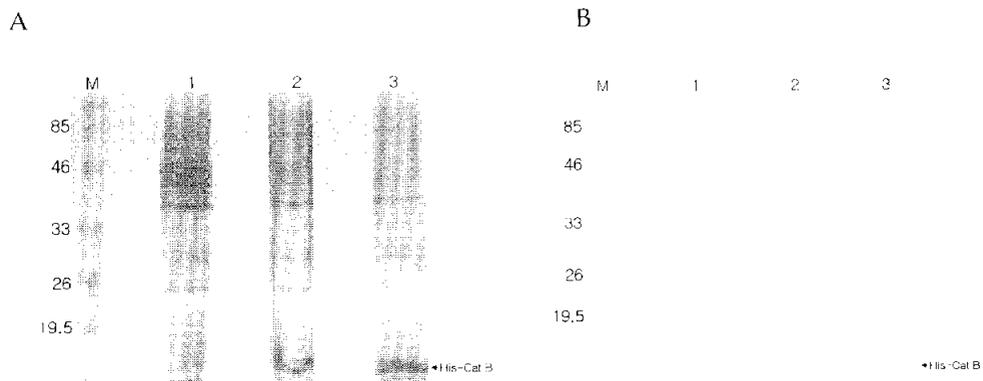


Fig. 3.7. Expression, extractions and western blotting of recombinant cathepsin B partial protease. Protein samples were separated by SDS-PAGE (10%) and visualized by coomassie R-250 blue staining. lane M, standard size marker; lane 1, whole cell lysates of *E. coli* with expression vector (pET-Self) only; lanes 2, 3 cathepsin B partial expressing *E. coli* induced with 0.4 mM IPTG for 3 h at 37°C: lane 2, total fraction; lane 3, inclusion fraction. The positions of standard size markers are shown on the *left*.

5' GGACA CTG ACA TGG ACT AAG GAG TAG AAA AAA CAT AAA TAA ATT AAA TAA ACA AAC 56
AAA TAA TTC AAT ATG CCT CCC AAA GTC GAC CCC AAC GAA ATT AAA TAC ATC AGA 110
ATT AAA GTC TTC GGA GGA GAA GGA GGA CCC GCC ACC TTA GCC CCT AAA TTA 164
GGT CCC TTA GGT CTT AAC GCA AAT AAC TCT TTC ACT TTA GGG AAC ACG AAG GAG 218
TAG AGC GAC TGG AGC ACG AGG ACA CTG ACA TGG ACT GAA GGA GTA GAA ACG ACT 272
GGA GCA CGA GGA GCA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GGT AGA AAA AAA AAA AAA AAA 326
ATG AAA ACA GCC GCT ATC TTG TTA GTT TTG TTG GCC TTA GCC GGA ACA TCT CTC 380
M K T A A I L L V L L A L A G T S L 18
TTC TTC **TAA** GAA AAT **TAA TAG** ACC TCT TTA GAA GCT ACT GCA TTC GGA AAA TTC 434
F F *Q* E N *Q Q* T S L E A T A F G K F 36
AAA GAA TGG AAA **TAA** AAT CAC AAC CTA GTC TAC TCT TCA AGT GAA GAT GCC TAT 488
K E W K *Q* N H N L V Y S S S E D A Y 54
AGA TTC **TAA** GTT TAT TTT GAA AAT TTC **TAA** TTT GTC GAA GAA TTT AAC GCA AAT 542
R F *Q* V Y F E N F *Q* F V E E F N A N 72
AAC TCT TTC ACT TTA GGA GTT GAA AAT **TAA** TTC GCT GCC ATG ACC AAT GAA GAA 596
N S F T L G V E N *Q* F A A M T N E E 90
TTC AAA GCC **TAA** TTT ACT AGT GAA ATT ATT AGC GAA GGA TAC AAT TAT CAA **TAA** 650
F K A *Q* F T S E I I S E G Y N Y Q *Q* 108
GTT GAC AGA AAT GTT TAT GAA GCC GTT AAT GCC CCT AGT GGA TCT GTT AAC TGG 704
V D R N V Y E A V N A P S G S V N W 126
GTT TCT AAA GGA GCT GTT **TAA** GGA GTT **TAA** AAT **TAG** GGA GTT TGT GGG TCT TGT 758
V S K G A V *Q* G V *Q* N *Q* G V C G S C 144
TGG GCT TTC TCT GCT GTT TGC TCT TTG GAA AGA CTT TAC AAA ATC AAC ACT GGA 812
W A F S A V C S L E R L Y K I N T G 162
AAA TTG CTC AGC TTC TCT GAG **TAA TAA** CTT GTT TCT TGT GAA CCT AAA TCT TAC 866
K L L S F S E *Q Q* L V S C E P K S Y 180
GGA TGT GAC GGA GGA TGG CCT GAA GCT GCC TTT GCT TAC TCA GCT ACC CAC GGA 920
G C D G G W P E A A F A Y S A T H G 198
TTA GAA TCT TCC GCC TCT TAC CCC TAC GTT CAA CAA AAA AAT GGA AAA ACC GCC 974
L E S S A S Y P Y V Q K N G K T A 216
TCT TGC CAA TAC AAT TCT TCT AAA GCC ACC AAA GGA ATT AAC AAA TCA TAC AAA 1028
S C Q Y N S S K A T K G I N K S Y K 234
AAT GTC GCC GCC AAT AGC CCT GAC TCC ATT TAC AAT GCC TTA GTT AAA **TAA** CCT 1082
N V A A N S P D S I Y N A L V K *Q* P 252
CTT TCC ATT TTA GTT GAT GCC AGT TCT TCA GTC TTT **TAG** CAC TAC GGT TCT GGG 1136
L S I L V D A S S S V F *Q* H Y G S G 270
GTT ATT AAC TCT ACT GCC TGT GGA ACT ACT TTG AAC CAC GCT ATT AAT GTT GTT 1190
V I N S T A C G T T L N H A I N V V 288
GGG TAT AGT GGG AGT GTT TGG ACT TTG AGA AAT TCT TGG GGA ACT ACT TGG GGA 1244
G Y S G S V W T L R N S W G T T W G 306
GAA AAA GGG TAT GCA AGA GTT **TAA** TAT TCT ACA GGA GCT GGA TAT TGT GGT ATG 1298
E K G Y A R V *Q* Y S T G A G Y C G M 324
AAC AGA TCA GCC TCA TAT CCC ACT AAC **TGA** TAA ATT TGA AAA ACA TAT AAT TTA 1352
N R S A S Y P T N * 333
GCA ATT TTT ATT AAA AAT TAT ATC ATA AAA ACA AAT TAA TAG TGT AAT ATT TTT 1406

TAA AAT ATT TAC ATA ATT TAA TCA AAT ATT CAT CAC ACA CTT ATT TAT TTA AAA 1460
TAA AAA AAA AAA AAA A 3' 1476

Fig. 3.8. The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of cathepsin L cysteine protease isolated from scuticociliate, *U. marinum*. The initiation (ATG) and termination (TGA) codons are shown in bold faces. Poly (A) tail is thick underline. The italic type (Q) in the amino sequence indicate gene of site-directed mutagenesis of cathepsin L. The gray box in the amino sequence indicate the putative signal peptide and propeptides of cathepsin L, respectively.

E

ScCtL -MKTAAILLV LLALAGTSLF FQENQOTSIE ATAFG----- KFKEWKQNHN LVISSS-EDA 53
 PtCtL -----MLL GASLYINNTQ EVSDEIDTAN ----- LYANWKMKNY RRYTNQRDEM 43
 TpCtL --MNWAQLLI GLTLLGAATV YVITRPNAD GHLEH----Y AFQKPKRNFV VTYKNQGES 54
 SlCtL MRKGFALSLA VVGVAVAIV IALSETSSSQ SLYTADQDHI DFVHFMSRFS KAYKSKEEFE 60
 HsCtL --MNPTLILA AFCLGIASAT LTFDHSLEAQ ----- -WTKWKAMHN RLYG-MNEEG 46

R F N I N

ScCtL YRFQVYFENF QFVEEFNANN -----SFTLG VENQFAAMTN EEFKAQFTSE IISEGYNYQQ 108
 PtCtL YRYKVFTDML NYIRAFYESP E--EATFTLE LN-QFADMSQ QEFAQTYLS- -LKVPR TAKL 98
 TpCtL YRLSVFLEML KSIEANANP ---LSTHVEE VN-SFTDLTE EEFAARYLM- -KDLPQQMNK 108
 SlCtL MRLQQYKSN AFINNHSQN D--GTSFTLG PN-HLADYTH DEYKMLG-- -Y-KPRNKTG 113
 HsCtL WRRAVWEKMN KMIELHNQEY REGKHSFTMA MN-AFGDMTS EEFQVMNG- -FQNRKPRKG 103

ScCtL VDRNVYEAVN APSGSVNWVS KG--AVQGVQ NQGVCWSCWA FSAVCSLERL YKINTG--KL 164
 PtCtL NAANSNFQYK GA--EVDWTD NKKVKYPVK NQGSCWSCWA FSAVGALEIN TDIELN--RK 154
 TpCtL DLPILEMETL AAPQVIDWTA KN--VLPPVK NQQQCGSCWA FSTAGMLEGV YNIHESQTP 166
 SlCtL KEVYSTPNLK DIPESIDWRE KG--AVNAVK DQGQCGSCWA FSTIASLESR YFIETG--KL 169
 HsCtL KVFQEPLFYE AP-RSVDWRE KG--YVTPVK NQGQCGSCWA FSATGALEGQ MFRKTG--RL 158

ScCtL LSFSEQQLVS CEPK----SY GCDGGWPEAA FAYSATHG-L ESSASYPVQ QKNGKTASCQ 219
 PtCtL YELSEQDLVD CSGP--YDND GCNGGWMDSA FEYVADNG-L AEAKDYPT- ---AKDGTCK 207
 TpCtL ISFSEQQLVD CCGAQGFCE GCNGAWPTDA VAYTQKFG-I VQESQYAYT- ---AKDGSCK 221
 SlCtL QSLSEQQLVD CSKNG---NE GCNGGDMGLA MDYIASAGGV ETEKDYPV- ---GKDQTCA 222
 HsCtL ISLSEQNLVD CSGP--QGNE GCNGGLMDYA FQYVQDNGGL DSEESYPYE- ---ATEESCK 212

ScCtL YNSSKATKGI NKSYKNVAAN SPDSIYNALV KQPLSILVDA SSSVFQHYGS GVINSTACG- 278
 PtCtL TSVKRP-Y-T HVQGFKDIDS CDELAQTIQE R-TVAVAVDA N--PWQFYRS GVLSKCTKN- 261
 TpCtL TALQGTGY-K PSAQFQVAAT DAALQAALQV Q-PTISICVDA S--KWSSYSK GIFSNCsAKP 277
 SlCtL FEASKEVA-T DKGHINIVPG KFATLQAAIA EGPVSVIAIEA DSLFFQFYRS GIFDSSWCG- 280
 HsCtL YNPKYSVA-N DTGFVDIPKQ EKALMKAVAT VGPISVAIDA GHESFLFYKE GIYFEPDCSS 271

H

NSW

ScCtL TTLNBAINVV GYSG----- --SVWTLRNS WGTTWGEKGY ARVQYS-TGA GYCGMNRsAS 329
 PtCtL --LNHGvVLV GVQADGA--- ----WKIRNS WGSsWGEAGH IRLAGG---- DTCGICAAPS 308
 TpCtL SAADHAVLLV GLNADNT--- ----WKVRNS WGTsWQSGY ITLAAG---- NTCGLENYAI 326
 SlCtL TNLDHGVAAV GYGVDNGK-- --QYIVRNS WSDsWGLKGY INIANGDGN GMCGIQMEPV 336
 HsCtL EDMDHGVLVV GYGFESTESD NNKYWLvKNS WGEEWGMGGY VKMAKDR--R NHCGIASAAS 329

ScCtL YPTN- 333

PtCtL FPILG 313

TpCtL YATY- 330

SlCtL VPQL- 340

Fig. 3.9. Comparison of the deduced amino acid sequence of ScCtL and other cathepsin L-like protease. Abbreviation are: ScCtL, Scuticociliate cathepsin L (not access); PtCtL, *Paramecium tetraurelia* (CAA62869); TpCtL, *Tetrahymena pyriformis* (BAA31161); SlCtL, *Stylonychia lemnae* (AAF43193); HsCtL, *Homo sapiens* cathepsin L (NP_001903). A vertical arrow indicates the putative signal peptide cleavage site. (Martoglio and Dobberstein 1998; Nielsen et al., 1997). The conserved 'ERFNIF' and 'NSW' motif is shown in the bold face and italic type.

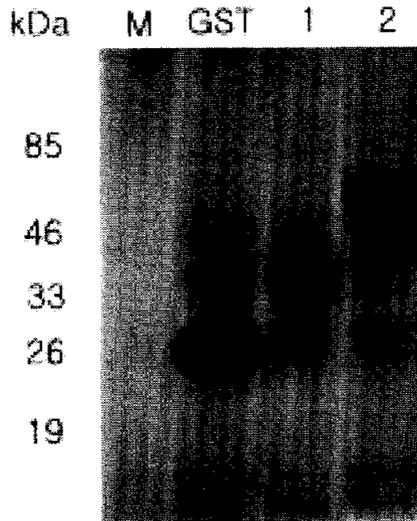
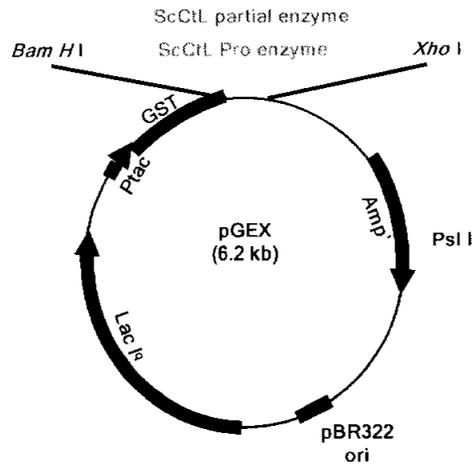


Fig. 3.10. Expression of recombinant cathepsin L cysteine protease. Protein samples were separated by SDS-PAGE (10%) and visualized by coomassie R-250 blue staining. lane M: standard size marker; lane GST: whole cell lysates of *E. coli* with expression vector (pGEX-Self) only. lanes 1: cathepsin L partial expressing *E. coli* induced with 0.4 mM IPTG for 3 h at 37°C. lane 2: cathepsin L promature form expressing *E. coli* induced with 0.4 mM IPTG for 3 h at 37°C. The positions of standard size markers are shown on the left.

3. 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease의 정제 및 기능 분석

3.1. 스쿠티카충의 cysteine protease 부분정제

DEAE-Sepagel HPLC 칼럼을 이용하여 NaCl의 농도에 의해 용출구배방법으로 분리시에 azocasein 기질을 이용하여 3개의 큰 protease 활성 분획물을 얻을 수 있었다 (Fig. 3.11). 이러한 분획물들을 다시 SDS-PAGE와 cathepsin B 항체에 대한 western blotting을 실시하였다 (Fig. 3.12). Fig. 3.12에서 보는 바와 같이 30번째 분획물에서 cathepsin B 에 대한 면역반응이 나타남을 알 수 있었다. 각 분획물은 각각 모은 후, amicon을 이용하여 농축하였다. 농축된 샘플은 cathepsin B cysteine protease의 특이 기질인 Z-RR-AMC를 이용하여 peptidolytic activity를 측정하였다.

3.2. 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease의 생화학적 특성분석

Fig. 3.11에서 부분 정제된 스쿠티카충의 분획물에 대하여 이미 만들어져 있는 rabbit anti-cathepsin B partial polyclonal antibody를 이용하여 western blotting을 실시하였다. Western blotting의 결과 분획물 32-38번에서 대략 29 kDa의 cathepsin B cysteine protease에 대하여 면역반응이 나타났었다 (Fig. 3.12). 이러한 one step purification 과정을 통하여 ZRR-MCA를 기질로 사용한 활성을 측정시에 crude 추출물로부터 12.8 배의 활성증가와 32%의 yield 및 마지막 활성이 719 U/mg으로 나타났다 (Table 3.4). 분리한 효소가 gelatine에 대한 protease 활성을 띄는 지를 검색하였을시에도 western blotting에서 나온 결과와 마찬가지로 대략 29 kDa의 단백질이 검출되었다 (Fig. 3.13). 이 결과를 바탕으로 하여 다양한 cysteine, aspartic, thiol 및 serine 억제제하에서 cathepsin B 활성의 변화를 측정하였다. 그 결과 cysteine protease 억제제로 알려진 E-64 (30 uM)와 leupeptin (100 uM)하에서 이 분획물들은 fluorigenic activity이 농도 의존적으로 완전히 억제됨을 알 수 있었으나, 다른 억제제

에 대하여서는 영향을 받지 않음을 알 수 있었다 (Table 3.5). 따라서, 이 분획물들은 cysteine protease임을 알 수 있었다. 더불어, 이 분획물들의 flurogenic activity에 있어서의 pH, 온도에 대한 영향을 조사하였을시에 pH에 대하여 acidic한 상태에서 강한 활성을 나타내었으며, 온도는 37°C에서 강한 활성을 보였다 (Fig. 3.14).

3.3. cathepsin B cysteine protease의 기능 분석

숙주에 감염된 스키투카충의 cathepsin B cysteine protease 분획물의 기능을 규명하기 위하여 넙치, 틸라피아, 쥐에 대하여 hemolysis 활성을 측정하였을시에 특이하게도 넙치 혈구에서만 약간의 hemolysis 활성을 나타내었다 (Fig. 3.15). 또한, 숙주인 어류 주화세포에 대한 cytotoxic 활성을 측정하였을 때, 약간의 cytotoxic 활성이 나타난다는 사실을 확인할 수 있었다 (Fig. 3.16).

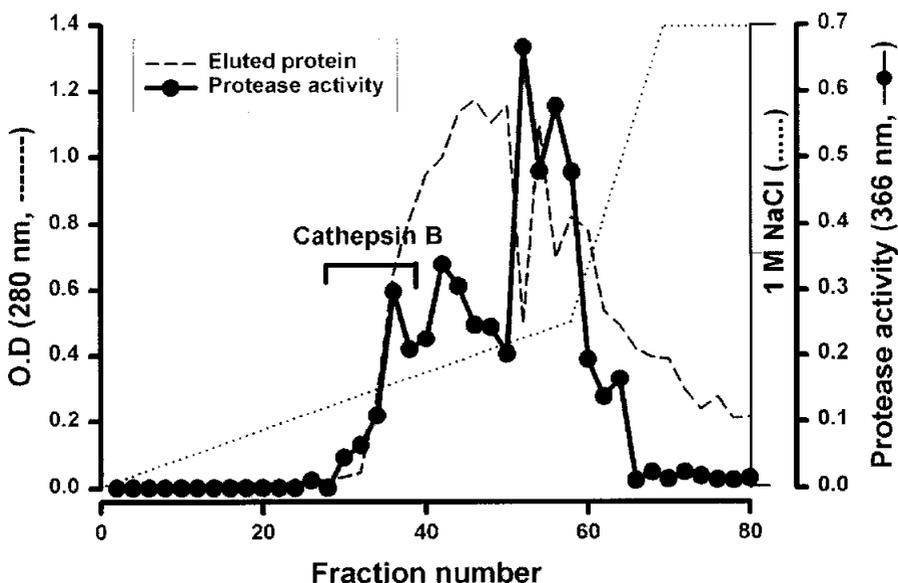


Fig. 3.11. Chromatography of protease activity through a preparative DEAE-sephagel HPLC column. Samples from scuticociliate were prepared, extracted, and proceed as described under "Materials and Methods." Eluted fractions (3 ml) were assayed for protein (---) and protease activity (●---).

Table 3.4. Purification of the partial purified protein. Activity was determined with ZRR-AMC (40 μ M) as a substrate. One unit of enzymatic activity (U) is defined as the amount (in μ mol) of AMC cleaved per min at 37°C.

Step	Total protein (mg)	Total activity	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	96	5376	56	1	100
DEAE-gel	2.4	1726	719	12.8	32

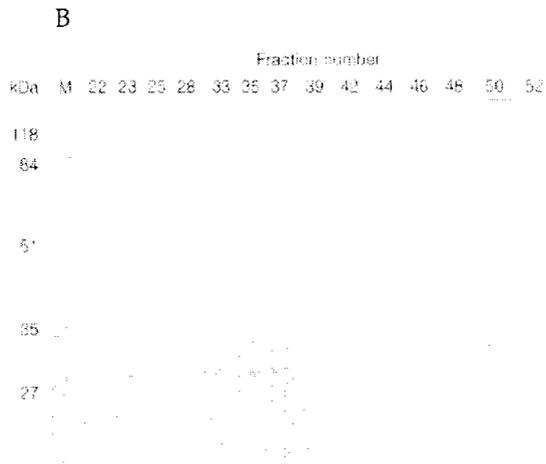
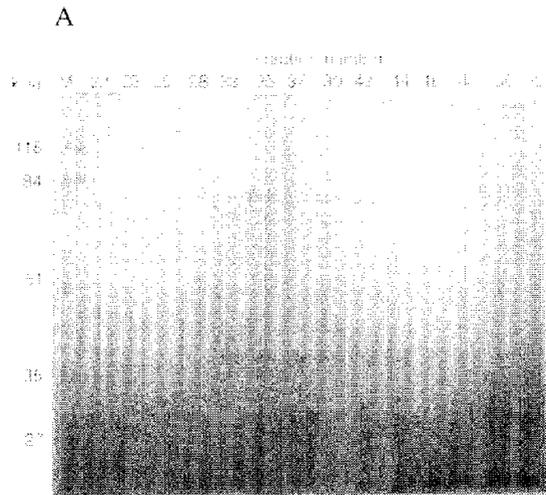


Fig. 3.12. SDS-PAGE and Immunoblotting analysis of cathepsin B cysteine protease. Peak fractions (22-52) from the DEAE-Sephagel column were subjected to SDS-PAGE on a 12% gel (A), and blotted with rabbit serum raised against ScCtB (B). The positions of molecular size standards are shown at *left*.

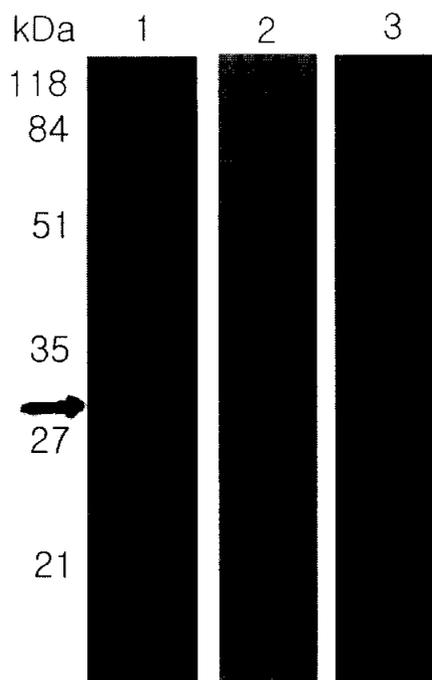


Fig. 3.13. Substrate gel (zymography) of the partial purified ScCtB. The partial purified enzyme was subjected to electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin. The gel was incubated in 50 mM Hepes buffer/pH 7.5 for overnight at 37°C. After staining with 0.1% comassie brilliant blue, the gel was destained with destaining solution (40% methanol, 7% acetic acid). Areas of proteolysis appear as clear regions in the gel. The arrow indicate the presumed ScCtB enzyme. Lane 1, extract sample; lane 2, not binding after DEAE-Sephagel column; lane 3, partial purified ScCtB fraction (36).

Table 3.5. Effects of various inhibitors on the enzyme activity of the partial purified ScCtB. Results are the mean from four independent experiments.

Subfamily of Protease	Compound	Concentration	Enzyme Activity	
	Inhibitor	μM	% control	
Aspartic	Pepstatin	50	107	
		100	118	
Serine	PMSF	500	98	
		1000	93	
Metallo	EDTA	1000	89	
		2000	80	
		1,10-Phenanthroline	1000	66
			2000	68
Cystine	E-64	5	43	
		20	32	
		30	2	
		10	4	
		100	1	

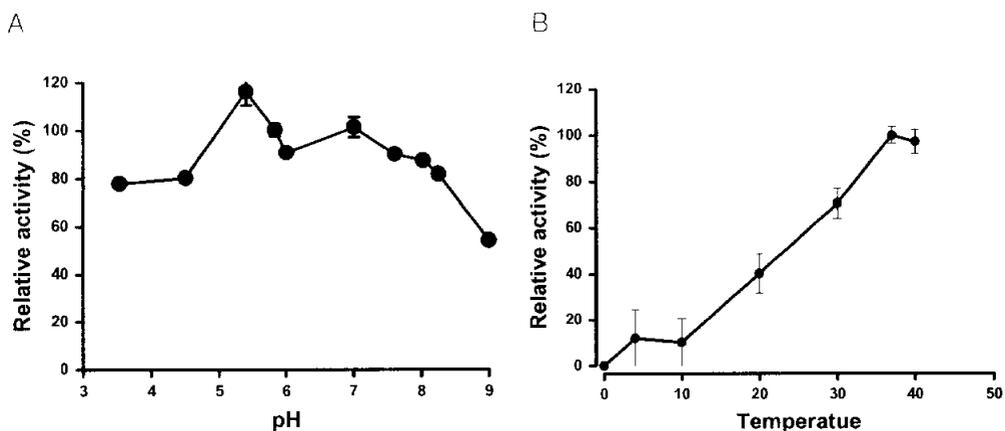


Fig. 3.14. Determination of the optimum pH (A) and temperature (B) on flourogenic activity with ScCtB. Protease activity of the pooled-DEAE eluate (ScCtB) was determined on ZRR-AMC substrate in the pH range 2-9. The relative activities are shown as the activity at using 40 μ M ZRR-AMC as substrate are 100%.

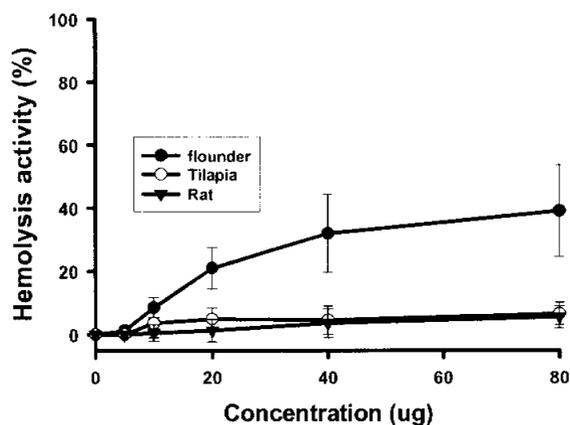


Fig. 3. 15. Effects of ScCtB on hemolytic activity. Hemolytic activity of the pooled-DEAE eluate (ScCtB) was determined on hydrolyzing blood cell in reaction mixture. The relative activities are shown as the activity at using 1% triton X-100 as sample are 100%.

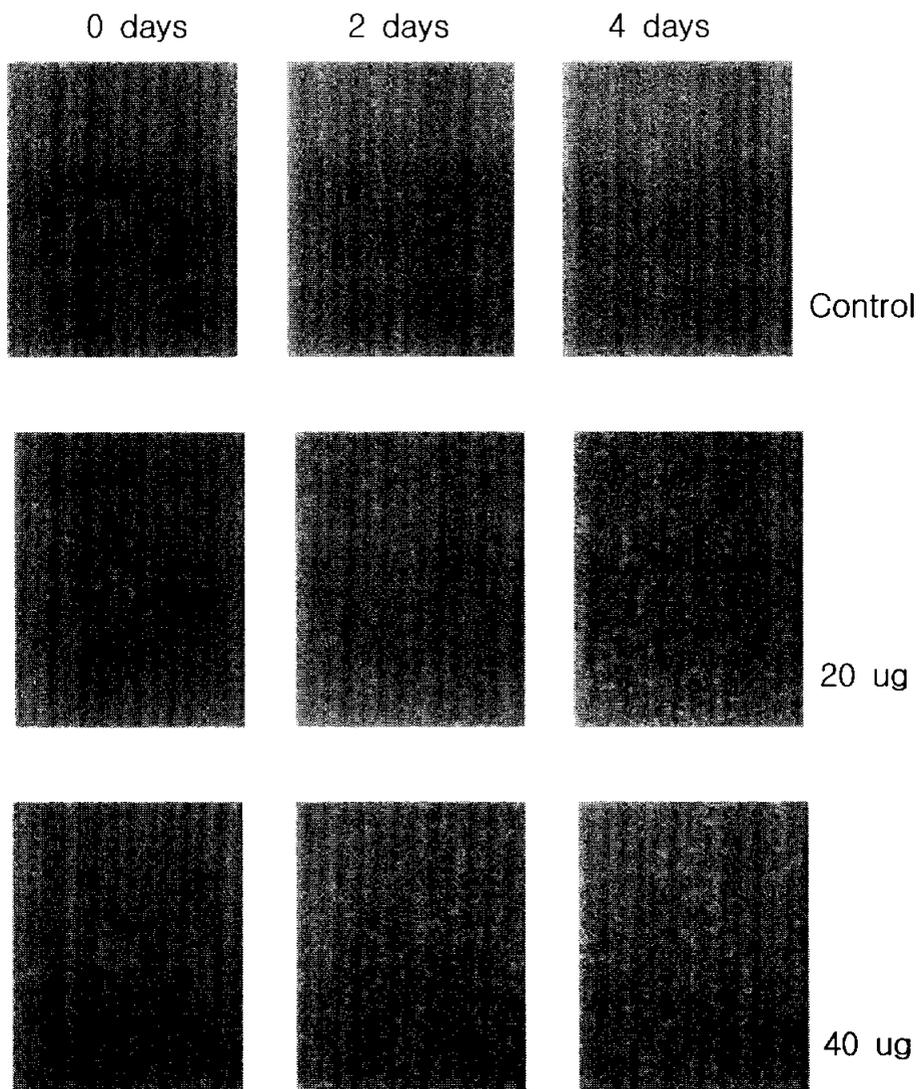


Fig. 3.16. Effect of cytotoxicity on fish cell line with ScCtB. Cytotoxicity activity of the pooled-DEAE eluate (ScCtB) was determined with microscopic examination. The pooled-DEAE eluate was incubated with fish cell lines (FFN) in medium under various conditions.

IV. 고찰

넙치에 기생하는 스키테카충은 넙치 치어와 자어에서 어류의 조직을 파괴하면서 대량폐사를 일으키는 protozoan 섬모충이다. 이 기생충에 의한 대량폐사의 원인 규명을 위해 현재 형태학적 특성 및 다양한 효소활성에 대한 연구가 수행되고 있으나 (Iglesias et al., 2003; Jee et al., 2001; Kwon et al., 2002, 2003; Lee et al., 2003), 아직까지도 명확하게 밝혀져 있지 않다. 이전에 연구들에서 스키테카충에서 cysteine 및 metallo protease가 넙치 조직의 파괴 및 전신감염에 있어서 중요한 매개체로서 작용한다고 보고하였다 (Kwon et al., 2002, 2003). 기생충 cysteine protease는 세포 내 단백질 대사, 숙주-기생충 부착 (host-parasite attachment), 숙주 면역회피 (immuno-evasion), excystment / encystment 및 전구단백질 및 단백질의 modification 과 같은 다양한 생물학적 기능을 가진다고 보고되었다 (McKerrow, 1989; Sajid and McKerrow, 2002).

본 장은 스키테카충으로부터 분리한 추출물의 protease 활성을 통하여 acidic, neutral, basic한 형태의 protease가 존재한다는 사실을 알 수 있었으며, 효소 활성이 다양한 cysteine protease 억제제들에 의하여 억제되었다. 또한, 분자생물학적 접근법을 통하여 두 종류의 cathepsin cysteine protease 유전자를 클로닝 및 발현시켰다. 이 중 기생충 cathepsin cysteine protease는 섬모충의 특성상 *E.coli*에서 과발현시에 종결코돈으로 인식되는 부위로 인하여, C-terminal 부위의 일부분만을 과발현시켜서 얻은 스키테카충의 재조합 cathepsin B cysteine protease (ScTb)를 얻었다. 얻어진 재조합 단백질은 토끼로부터 ScCtB에 대한 다클론 항체를 얻었다. 얻어진 항체를 이용하여 스키테카충으로부터 ScCtB 효소를 정제하였고 그 생화학적 특성을 밝혔다. Cathepsin B-like cysteine proteases의 대표적인 중요한 특징은 아미노산 서열중에서

conserve한 Pro-Tyr¹⁰³ motif와 Cys¹²⁸ (cathepsin B numbering)사이의 occluding loop의 삽입이며, 이 loop는 두 인접한 cathepsin B의 depeptidyl carboxypeptidase 활성을 책임지는 히스티딘 잔기들 (His¹¹⁰, His¹¹¹)로 특징지어진다 (Sajid and McKerrow, 2002). 또한, GNFD motif의 존재가 나타남을 알 수 있었다. 더불어, 다른 종과의 아미노산 alignment 결과 스쿠티카충의 cathepsin B 효소는 진핵생물의 cathepsin B 효소의 일반적인 특징을 나타내지만 다른 일반적인 척추동물의 cathepsin B와는 달리 Cys 216 잔기가 하나 더 포함되어 있어 disulfide bond를 하나 더 가지고 있을 수 있는 가능성을 나타내었다. 이는 구조적으로 다른 종에서 발현되어지는 cathepsin B와는 기능적인 차이가 나타날 수 있음을 암시해준다. Cathepsin B와는 다르게 cathepsin L cysteine protease는 다양한 기생충 종에서 발견되고 있으며, 이 단백질은 세포외로 분비되하므로써, 병원성에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Suzuki et al., 1998; Volkel et al., 1996). Cathepsin L cysteine protease는 proregion내에 conserve한 inter-spaced motif인 'ERFNIN (Glu, X₃, Arg, X₂, (Ile/Val), Phe, X₂, Asn, X₃, Ile, X₃, Asn)'을 가진다고 보고되고 있으며 (Sajid and McKerrow, 2002), 본 실험에서 얻어진 스쿠티카충의 cathepsin L 유전자 또한 이 motif를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이러한 motif의 특성에 대한 연구는 현재 많은 종에서 이루어지고 있으나 아직 정확한 기작에 대한 연구는 많이 되어있지 않다. 본 실험에서 얻어진 이러한 motif가 거의 완전하게 'ERFNIN' 및 'NSW'을 가진다는 사실을 알 수 있으나, cathepsin L의 생화학적 특성을 가지는지를 알기 위해서 이 단백질의 site mutagenesis 통하여 종결코돈을 없앴으며, site mutagenesis 통하여 얻어진 유전자는 pGEX vector에 삽입하여 *E.coli* 에서 발현시켰다.

Tetrahymena 종 및 *Paramecium* 종에서 발견되는 cysteine protease들은 세포내에서 phagolysosome을 형성함으로써 세포내 소화에 관여하거나 세포외 소화에도 관여한

다고 보고한다 (Banno et al., 1983; Volkel et al., 1996). 또한, 터봇, *Scophthalmus maximus*에서 스쿠티카질병을 일으키는 종으로 알려진 *P. dicentrarchi* 추출물의 cysteine protease 활성이 feeding에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Iglesias et al., 2003). 숙주 단백질의 분해에 관여한다고 보고되는 cysteine protease는 스쿠티카질병을 일으키는 종인 *U. marinum*에서도 같은 효과를 나타내는 것으로 보아졌다. 이는 넙치 혈구에 대하여 스쿠티카충의 cathepsin cysteine protease가 hemolysis 활성을 나타내므로 nutrition에 중요한 역할을 하리라 추정되어진다.

또한, 구조적 차이에 면역회피와 같은 기능을 할 수 있으리라 추정된다. 이는 최근 연구들에서 granule에서 유도되는 표면 cathepsin B가 세포독성 lymphocyte의 파괴에 의한 자가 방어 (self protection)을 유발한다고 제안하였다. Lysosomal cathepsin B가 cytotoxic T lymphocytes 접근 하였을시에 perforin과 같은 cytotoxic mediator를 가수분해할 수 있다고 보고되었다 (Catalfamo and Henkart, 2003; Balaji et al., 2002). 이번 연구 결과들이 스쿠티카충에서 얻어진 cathepsin B와 L이 숙주 면역을 회피하는 기능을 가지고 있지 않느냐 추측해 볼 수 있다. 이를 확인하기 위해 넙치의 perforin (AB084905)의 일차구조를 분석하였을시에 단백질 서열 중 Arg-Arg 및 Lys-Arg 서열이 각각 3군데, 2군데씩 존재함을 알 수 있다. 이는 cathepsin B cysteine protease 효소가 작용할 수 있음을 알 수 있다 (Chapman et al., 1997). 그러나, 이러한 결과가 숙주-기생충 상호작용을 증명할 수 있는지는 더 실험을 해야 한다고 보아진다. 따라서, 이러한 구조적 차이를 이용한 특이한 저해제를 찾는다면, 기생충 구제약 개발에 기여 할 수 있을 것이라 사료된다.

V. 요약

넙치에 주로 감염되는 스쿠티카충의 protease 활성을 검색하였을시에 다양한 protease가 작동함을 알 수 있었다. 이 중에서 cathepsin B 및 L cysteine protease를 스쿠티카충으로부터 클로닝, 발현 및 특성을 분석하고자 하였다.

1. 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease의 특성분석

클로닝 된 cathepsin B 유전자는 총 1,244 bp이며, 33 bp 5'-untranslation region, 158 bp 3'-untranslation region, 1,053 bp의 ORF로 이루어져 있다. 이 단백질은 preproenzyme으로 구성되어진 350개의 아미노산으로 17개의 putative signal peptide와 68개의 propeptide, 265개의 mature enzyme으로 구성되어져 있다. 유전자의 일차 구조분석를 통해서 cathepsin B 유전자의 특징인 'GNFD' motif를 가지고 있음을 알 수 있었으며, 효소활성의 특성들을 통해서 스쿠티카충의 cathepsin B는 cathepsin B family에 포함됨을 알 수 있었다. 특성을 규명하기 위하여 스쿠티카충을 one step 과정을 통하여 분리하여 스쿠티카충에 대한 항혈청을 이용한 western blotting을 실시 하였을시에 30 번째 분획물에서 cathepsin B 활성을 지닌 물질을 얻을 수 있었다. 이것의 SDS-PAGE 및 gelatine-acrylamide copolymerized gel로 그 크기를 측정하였을시에 29 kDa로 나타났으며, zymography protease 활성이 나타남을 알 수 있었다. 게다가, cathepsin B specific peptide 기질인 N-carbobenzyloxy-arginyl-arginyl-7-amino-4-methylcoumarin (ZRR-MCA)를 이용하여 활성을 측정시에 강한 효소활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이 peptide 기질을 이용하여 효소활성을 측정시에 적정 pH가 5.5로 나타났으나, pH 4에서 8사이에서도 활성이 유지됨을 알 수 있었다. 다양한 protease inhibitor를 이용하여 측정시 전형적인 cysteine protease inhibitor인 E-64와 leupeptin에 의해서 억제되나 다른

inhibitor에 의해서는 억제제가 나타나지 않았다. 이 효소의 기능을 규명하기 위하여 어류주화세포에 이 효소를 첨가시 약간의 cytotoxicity가 나타났었다. 쥐, 넙치, 털라피아로부터 얻은 혈구에 대하여 이 효소의 첨가는 넙치 혈구에 있어서 약간의 hemolysis 활성을 나타내었다. 이는 이 효소가 숙주와 기생충간의 상호작용시 숙주 방어 및 nutrition에 있어 주로 기생충의 nutrition에 관여하리라 추정된다.

2. 스키타카충의 cathepsin L cysteine protease의 특성분석

클로닝 된 cathepsin L 유전자는 1,476 bp이며, 326 bp 5'-untranslation region, 151 bp 3'-untranslation region, 999 bp의 ORF로 이루어져 있다. 이 단백질은 preproenzyme으로 구성되어진 333개의 아미노산으로 25개의 putative signal peptide와 93개의 propeptide 및 215개의 mature peptide로 구성되어져 있음을 알 수 있었다. 유전자의 일차구조분석을 통해서 cathepsin L 유전자의 특성인 'ERFNIN' 'NSW' motif를 가지고 있음을 알 수 있으므로 스키타카충의 cathepsin L 유전자는 cathepsin L family에 포함됨을 알 수 있었다. 섬모충을 *E.coli* 에서 발현시 종결코돈의 문제를 해결하기 위해 megaprimer PCR을 이용한 site-directed mutation법을 이용하여 point mutation을 실시하였다. Point mutation을 실시하여 얻어진 유전자의 promature enzyme부분은 pGEX vector에 삽입하여 발현시켰을시에 대략 60 kDa 의 사이즈가 발현됨을 알 수 있었다.

종합 토 의

현재 각 나라는 새로운 해양법의 발효로 인하여 각 나라마다 배타적 경제수역을 늘리고 있는 실정이며, 이에 따라 기르는 어업의 중요성은 날로 증가하고 있다. 우리나라의 양식산업은 1990년대 후반부터 국민의 소득향상에 의하여 양식 산업이 대형화되고 있으며, 소비자의 기호변화에 따라서 부가가치가 높은 어종을 중심으로 양식품목이 다양화, 고급화되고 있는 실정이다. 이 중 현재 우리나라 전 연안에서 양식되고 있는 넙치 *Paralichthys olivaceus*의 양식생산은 오래전부터 이루어져 왔으며, 종묘생산은 1970년대 후반부터 본격적으로 시작되어 현재까지 해수 양식 어종에서 가장 높은 비중을 차지하는 경제적으로 가장 중요한 양식 어종이다. 이와 같은 양식 산업의 생산증대와 더불어 새로운 병원체에 의한 양식현장에서의 어병 발생도 매년 급증하여 그로 인한 경제적 피해가 상당한 비중을 차지하고 있다. 이러한 어병 발생 인자 중 해산어의 섬모충 질병중에서 가장 심각한 질병을 일으키는 것으로 알려진 스쿠티카증 (Scuticociliatosis)은 넙치에서 표피박리, 궤양증을 일으켜 종묘장에서 두부나 체표가 하얗게 변하면서 치어가 대량 폐사되는 경우로 나타난다. 이러한 병든 넙치는 다양한 증상을 나타내며 체표 염증, 지느러미 연조, 꼬리자루 노출 및 두부 손상등이 특징적이다. 양식 산업의 생산증대와 더불어 새로운 병원체에 의한 양식현장에서의 어병 발생도 매년 급증하여 그로 인한 경제적 피해가 상당한 비중을 차지하고 있다.

다양한 해양섬모충들은 온도, 염분, pH 등과 같은 외부환경에 대하여 적응하는 능력을 가지고 있다. 이러한 외부환경의 변화에 대하여 *Tetrahymena* 종 등은 온도적응을 위하여 PC와 PE가 중요한 역할을 한다고 보고하고 있으며, PC내의 linolenic acid (18:2)의 양이 줄어들면서, γ -linolenic acid (18:3)의 양이 증가한다고 보고하고

있다 (Watanabe et al., 1980; Maruyama et al., 1982). 더불어, 이러한 지질내 (PC & PE)의 고도불포화지방산 (HUSFA)의 영속성은 해양 섬모 원충류의 낮은 온도에 대한 적응과 낮은 수심에서의 hydrostatic pressure를 증가시키는 생리적 적응에 관련이 있다고 보고되었다 (DeLong and Yayanos, 1985; Patton, 1975). 해양 섬모충인 *Parauronema acutum*의 총 지질 중 인지질 성분은 75% 정도를 차지하며, 나머지는 중성지질로 이루어져 있다고 보고되며 특히, 인지질 중 PE, PC가 각각 33%, 24%를 차지하는 major 인지질이며, PI와 PS가 각각 11%, 7.8% 정도를 차지하고, SPL등이 주로 minor 인지질로 알려져 있다 (Sul and Erwin, 1997). 게다가 *Tetrahymena* 종과 *Paramecium* 종에서도 마찬가지로 PE > PC > PI > PS순으로 구성되어져 있다고 보고된다 (Sul and Erwin, 1997; Kates and Volcani, 1966; Jonaha and Erwin, 1971; Berger et al., 1972; Rhoads and Kaneshiro, 1979). 스쿠티카충에서 나타난 인지질의 성분은 다른 해양 *Tetrahymena* 나 *Paramecium* 과 같은 기생충 등에서 나온 결과와 매우 유사한 것으로 나타났다. 따라서, 스쿠티카충의 인지질의 성분은 전형적인 해양 섬모충의 성분과 같음을 알 수 있었다. 더불어, 기생충은 다른 포유류와 달리 특이하게 phosphonolipid라는 인지질을 가지는데 인지질내에서 약 60% 가량을 차지하며, 그 대부분이 PC로 이루어져 있다고 보고되고 있다 (Sul and Erwin, 1997; Kennedy and Thompson, 1970). 몇몇 논문들은 섬모충에서 phosphonolipid와 인지질가수분해 효소가 기생충의 침투 및 방어등에 중요한 역할을 수행한다고 보고하고 있다 (Florin-Christensen et al., 1986; Kennedy and Thompson, 1970).

넙치에 기생하는 스쿠티카충은 넙치 치어와 자어에서 어류의 조직을 파괴하면서 대량폐사를 일으키는 원충류성 섬모충이다. 이 종의 원인인자로서는 현재 형태학적 특성 및 다양한 효소활성을 측정하므로써 원인인자를 규명하는 연구를 수행하고 있으나 (Jee et al., 2001; Kwon et al., 2002, 2003; Lee et al., 2003), 아직 많은 연구는 되

어져 있지 않다. 현재 기생충의 감염인자로 많은 효소가 관여한다고 알려져 있는데 *T. cruzi* 에서는 G-protein 류 단백질 (GTPase, dynamin, Rab5, Rab7, ecto-ATPase), phospholipase 류 (PI-PLC, PLA2, PLD, PC-PLC), protease 류 활성이 관여한다고 보고되기도 한다 (Wilkowsky, 2002; Bisaggio and Peres-Sampaio, 2003). 어류 기생충에서 Cryptobiasis을 유발시키는 *Cryptobia* 종에서는 대개 protease 및 glycosome이 중요한 역할을 수행한다고 보고되고 있으며 (Ardelli et al., 2000; Zuo and Woo, 1997, 1998), 채널메기의 백점충의 침투에 있어서는 lectin의 성분이 중요한 역할을 수행한다고 보고되기도 한다 (Xu et al., 2001). 막 인지질은 인지질가수분해효소, protease, 당단백질, 탄수화물 등과 같은 물질과 복합적으로 이루어져 있어 기생충의 침투, 방어 및 대사 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 (Vial et al., 2003), 스키투카충도 이와 같은 형태로 이루어져 있음을 알 수 있었다. 이 중에서 다양한 기생충에서 분리되는 항원인자들 중 GPI-anchored protein인 인지질가수분해효소와 protease는 중요한 항원성으로 생체막에서 발견되며, 분리 정제되어 그 특성이 보고되고 있다 (Paquette et al., 2001; Sajid and Mckerrow, 2002).

현재 기생충류에 대한 백신개발은 주로 기생충 세포막의 합성을 조절, 제어, 억제 및 파괴하는 방향으로 나아가고 있으며, 이러한 주 target은 주로 인지질의 종류인 PC에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다 (Harnett and Harnett, 2001; Vial et al., 2003). PC는 원핵 및 진핵 병원체의 주요성분으로 대개 인지질가수분해효소와 연관된 성분으로서 광범위하게 인식되어지며, 두 종류의 PC-PLD 및 PC-PLC 가수분해효소에 의하여 조절되어진다고 알려져 있다 (Besterman et al., 1985; Price et al., 1989). PC-PLD는 PC를 가수분해하여 대사산물로 PA와 choline을 생성하며, 생성된 PA는 DAG나 lysophosphatidic acid로 변환하여 섬유아세포에서 mitogenesis의 promotion, neutrophils에서 respiratory burst의 자극, specific protein kinase 및

phospholipid의 대사조질 단백질의 활성화와 actin polymerization에 대한 영향 등 세포내 다양한 생리적 기능에 관여한다고 알려져 있다 (Exton, 1997, 2002; Knauss et al., 1990; Olson and Lambeth, 1996). PC-PLC는 PC의 phosphodiester bond를 가수분해하여 대사산물로 DAG와 phosphocholine이라는 두개의 이차전달물질 (second messenger)을 만든다고 알려져 있다. 이 중 DAG는 세포내의 PKC라는 단백질을 활성화시켜 세포내의 다양한 대사, 성장 및 분화에 관련한다고 알려져 있다 (Wakelam, 1998; Han et al., 1999). 이 효소는 포유류 세포에서 현재 주로 연구가 잘 되는 효소로서 포유류 세포의 mitogenic signaling, 난 성숙, Fas-활성의 유발 및 식세포에서 Fc receptor의 유발에 의한 inducible nitric oxidase synthase (iNOS)를 위한 NF- κ B transcription factor로서 작용한다고 보고되고 있다 (Shin and Han, 2000; Han et al., 1999; Lennartz, 1999; Bestermann et al., 1985; Sands et al., 1994).

다양한 종에서 분리되는 PC-PLD는 모든 세포에 존재하는 효소이며 대부분 당질화된 인지질에 붙어 있는 효소로 존재하며, 현재 해양 섬모 원충류에서 PC-PLD의 기능 및 특성에 대한 연구가 많이 보고되고 있다. 이 중 섬모 원충류인 *Tetrahymena* 종의 배양에서 early lag phase에서 PLC와 PLD가 생존 (survival), 죽음 (death) 및 분화 (differentiation)등에 관여하며, hormonal imprinting에도 관여한다고 보고하였다 (Kovacs et al., 1996; Kovacs et al., 1997; Rasmussen and Rasmussen, 1999, 2000; Wang et al., 2001). 몇몇 보고서에서는 *Tetrahymena* 배양에서 일어나는 PC-PLD 활성이 포유류세포의 PC-PLD signal의 특성과 유사하다고 보고하고 있다. 그러나, *Leishmania donovani* 종에서는 PC-PLD가 급성 (acute) osmotic stress에 대한 반응을 나타낸다고 보고되고 있으며, 분자생화학적 접근으로 *L. donovani*에는 human PC-specific PLD의 type와 같은 두 종류의 PC-PLD가 존재한다고 보고하였다 (Blum et al., 2001). *Paramecium* 종에서는 PC-PLD와 유사한 형태의 protein phosphatase에

대한 특성 및 분포에 대하여 보고되고 있는데 이 단백질이 ciliary motility와 cellular cargo transport에서 dyneins의 조절에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (Grothe et al., 1998). 스키투리카충의 막에 유래하는 PC-PLD는 고등척추동물과는 다른 형태를 가진다는 사실을 알 수 있었으며, 대개 막 유래 PLD (membrane bound PLD) 활성이 RhoA, Cdc42, Rac, GTP γ S 등과 같은 small G protein 류에 의하여 활성화되어진다고 보고되나 (Kwak et al., 1995; Malcolm et al., 1994; Ohguchi et al., 1996; Siddiqi et al., 1995), 스키투리카충 PC-PLD의 활성화에 있어서 small G protein인 Arf와 GTP γ S는 PLD 활성화에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 또한, 포유류 유래 PLD는 칼슘, 마그네슘 및 PIP $_2$ 등에 의하여 의존적인 활성을 나타낸다고 보고되며 (Exton, 1997, 2002; Kurz et al., 2004), 스키투리카충의 PC-PLD도 마그네슘과 칼슘이 활성화에 있어서 중요한 cofactor로서 작용한다는 사실을 알 수 있었다. 원충류 기생충들은 세포에 부착하여 살아가거나 혹은 자유 생활 기생충으로 살아가면서 외부 환경의 변화에 의해 숙주에 부착시 특이한 효소를 내는 것으로 알려져 있는데 그 중 phospholipase A2 (PLA2)와 PLD를 *Trypanosom cruzi* 배양액에 넣을시에 host-parasite attachment가 증가된다고 보고하였다 (Connelly and Kierszenbaum, 1984, 1985). 또한, *T. gondii*에서 인지질가수분해효소는 침투에 관여한다고 보고하였다 (Saffer and Schwartzman, 1991). 이러한 결과들은 인지질내에 존재하는 PLA2와 PLD들이 host-parasite의 상호관계에서 중요한 매개체의 역할을 하리라는 것을 암시해준다. 그러나, 본 연구에서 스키투리카충의 PC-PLD는 아무런 영향을 주지 않으나, 스키투리카충의 cyst 형성을 하는 것으로 보아, 외부 환경변화에 대하여 *T. gondii*의 기능인 cyst formation에 관여하지 않는가 추정되었다.

기생충 *T. gondii* 에서 발견되는 PC-PLC가 세포내 기생충 증식 (multiplication)과 cyst development에 관여하거나, host-parasite interaction에 중요한 역할을 한다는

사실을 보고하였는데 (Ricard et al., 1999), 본 연구에서 스쿠티카충으로부터 분자생화학적 특성이 다른 2 종류의 PC-PLC를 분리 하였다. 두 종류의 막 유래의 PC-PLC (mPC-PLC) 및 세포질 유래의 PC-PLC (cPC-PLC)는 넓치 식세포 및 host-parasite 상호작용에 관여한다는 사실을 알 수 있었다. 이 결과들로 스쿠티카충의 mPC-PLC는 아마도 스쿠티카충의 생리적 기능에 관여하는 것으로 대개 eukaryotic cell의 조절대사기능들과 유사한 역할을 하리라 추정되나, cPC-PLC는 다양한 역할을 하리라 생각되는데 특히, 넓치식세포에 대한 식작용의 영향 및 host-parasite attachment 실험을 통하여 이 단백질이 숙주 침투에 있어 중요하게 관여할 것으로 사료되었다.

이전 연구들에서 스쿠티카충의 cysteine 및 metallo protease가 넓치 조직의 파괴 및 전신감염 및 숙주방어 등에 있어서 중요한 매개체로서 작용한다고 보고하였다 (Kwon et al., 2002, 2003). 기생충 cysteine protease는 세포내 단백질 대사, 숙주-기생충 상호작용, 면역회피, excystment /encystment 및 전구단백질 및 단백질의 modification과 같은 다양한 생물학적 기능을 가진다고 보고되며 (McKerrow, 1989; Sajid and McKerrow, 2002), *Tetrahymena* 종에서는 cysteine protease가 세포의 환경으로 분비된다고 보고되었다 (Banno et al., 1983; Suzuki et al., 1998; Sajid and McKerrow, 2002). 이러한 다양한 cysteine protease의 중요성은 단백질 서열에 기초로 한 papain 계열로서 보고되어지며, 특이한 기질 특이성을 가진다고 보고되고 있다 (Kelley et al., 2003). Papain 계열의 cysteine protease는 주로 cathepsins 계열로 잘 분류 되어져 있으며, 이러한 기생충들은 기생충감염에 있어서 생물학적 및 병원성 인자로서 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다 (Lecaille et al., 2002). 본 논문에서 스쿠티카충으로부터 분리한 추출물에서 다양한 생화학적인 분석을 통하여 여러 종류의 protease가 존재함을 알 수 있었다. 이러한 활성들이 다양한 cysteine protease 제해제들에 의하여 억제됨을 알 수 있었으며, 분자생물학적 접근법을 통하

여 두 종류의 cathepsin cysteine protease 유전자를 클로닝하였다. 다양한 실험을 통해서 스쿠티카충의 cathepsin B enzyme은 진핵생물의 cathepsin B enzyme의 일반적인 특징을 나타내지만 다른 일반적인 척추동물의 cathepsin B와는 달리 Cys 216 잔기가 하나 더 포함되어 있어 disulfide bond를 하나 더 가지고 있을 수 있는 가능성을 나타내었다. 이는 구조적으로 다른 종에서 발견되어지는 cathepsin B와는 기능적인 차이가 나타날 수 있음을 암시해준다. 넙치 혈구에 대한 hemolysis 활성은 이 효소가 기생충의 nutrition에 관여한다는 사실을 알 수 있으며, 또한, 구조적 차이에 면역회피와 같은 기능을 할 수 있으리라 추정되었다. 이는 최근 연구들에서 granule에서 유도되는 표면 cathepsin B가 세포독성 lymphocyte의 파괴에 의한 자가 방어 (self protection)을 유발한다고 보고된다 (Catalfamo and Henkart, 2003; Balaji et al., 2002). 이를 확인하기 위해 넙치의 perforin (AB084905)의 일차구조를 분석하였을시에 단백질 서열 중 Arg-Arg 및 Lys-Arg 서열이 각각 3군데 2군데씩 존재함을 알 수 있었다. 이는 cathepsin B cysteine protease 효소가 작용할 수 있음을 알 수 있다 (Chapman et al., 1997). 이러한 연구들의 주 목적은 이러한 효소가 antiparasite chemotherapy을 위한 유용한 target으로 개발될 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문이다. 그러므로 많은 연구들이 이러한 효소의 특성, 특히 기질 특이성 및 저해제 개발등과 같은 것을 확립하는데 일차적 목적을 가지고 연구를 수행하고, 더 나아가 이 정보를 바탕으로 하여 antiparasitic agent의 design에 있어서 기초적인 정보로 사용되고 있다 (McKerrow, 1999).

본 논문을 종합하여 보면 우리나라 주로 양식 넙치에 질병을 유발하는 스쿠티카충이 숙주 침투시에 인지질가수분해효소가 중요한 역할을 수행하는 것을 알 수 있었으며, 숙주침투 후 숙주내의 생존 및 방어 (host defence)등에는 cathepsin cysteine protease가 중요한 역할을 하리라 추정된다. 이러한 인자들의 구체화는 양식 넙치에

있어 스쿠티카충의 발병의 확산을 최소화하는 기초적인 정보를 제공해주며, 나아가 이 질병에 대한 분자생화학적 기초지식을 얻을 수 있으리라 생각된다.

총괄 요약

기생충 *Uronema marinum*에 의한 스쿠티카충은 넙치양식에 있어 대량폐사와 같은 문제를 일으켜 심각한 경제적 손실을 일으키고 있다. 현재 이 기생충에 의한 대량폐사의 원인 규명을 위해 기생충의 형태, 배양 및 다양한 효소 활성 등에 관하여 연구되고 있으나, 아직까지는 이 기생충이 넙치에 어떻게 감염되고 또한, 숙주내에서 어떻게 생존할 수 있는지에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않다. 본 논문은 스쿠티카충 유래 인지질가수분해효소 및 cysteine proteases의 분자생물학적 특성 규명과 이들이 기생충의 숙주 감염시 어떠한 기능을 하는지를 조사하였다.

제 1장에서는 스쿠티카충의 숙주 감염시 생체막을 통한 기생충-숙주 반응의 특성을 알아 보기위하여 생체막 성분을 조사하였다. 스쿠티카충의 전체 지질 중 70% 가량은 인지질 (phospholipid)이며, 나머지는 중성지질로 구성되어져 있고, 인지질은 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), unidentified phospholipid (UP)가 major 인지질로, phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), cardiolipin (CL)은 minor 인지질로 구성되어져 있었다. 반면에 숙주인 넙치는 PC, PE, PI, PS 가 major 인지질이며, CL, UP가 minor 인지질로 분포되어져 있었다. 이상과 같이, 스쿠티카충과 숙주의 세포막의 조성의 차이, 특히 스쿠티카충의 다량의 UP 인지질은 숙주 감염시에 숙주와 기생충간의 생체막을 통한 숙주 감염시 중요한 역할을 할 것으로 추정되었다. 더불어, 스쿠티카충의 인지질내의 지방산 성분은 다중불포화지방산이 52.7%, 단일불포화지방산이 28.5%, 나머지는 포화지방산으로 분포되며, 중성지질내의 지방산 성분은 단일불포화지방산이 49.2%, 포화지방산이 30.1%, 나머지는 다중불포화지방산으로 구성되어져 있었다. 또한, 면역반응 분석을 통하여 스쿠티카충에는 다양한 항원이 존재하며, 그 중에서 papain cysteine protease가 중요

한 항원임을 알 수 있었다. 스쿠티카충의 Papain cysteine protease는 *in vitro* 배양동안 다양하게 변화하였으며, 이는 숙주 감염시의 병위성과 관련이 있을 것으로 사료된다.

제 2장에서는 스쿠티카충의 PC 가수분해 효소의 분리, 정제 및 생화학적 특성 규명 및 그 기능을 분석하였다. 스쿠티카충 막 유래 PC-PLD (mPC-PLD)는 생화학적 특성이 포유류와 다른 형태로 나타났다. 또한, *in vitro*의 PLD 활성화에 있어 이 효소는 small G protein 인 Arf, GTP γ S에는 아무런 영향을 받지 않으나, PIP₂에는 의존적인 활성을 나타내었다. 이 효소가 숙주-기생충 부착시 관여하는지를 조사하였을 때, 기생충 부착물에는 아무런 영향이 없으나 배지내에 기생충의 cyst가 형성되는 것을 관찰하였다. 따라서, 이 효소는 스쿠티카충의 숙주 침투에 관여하기보다 기생충의 외부 환경변화에 따른 cyst formation에 관여하리라 추정되었다. 스쿠티카충의 막 및 세포질에서 각각 분리된 PC-PLC (mPC-PLC와 cPC-PLC)는 효소 활성을 측정시에 mPC-PLC는 적정 pH 6.0 및 0.4 mM Ca²⁺ 이온에서, cPC-PLD는 pH 7.0 및 1.6 mM Ca²⁺ 이온에서 가장 큰 활성을 나타내므로 생화학적 특성이 서로 다른 효소로 나타났다. mPC-PLC는 숙주인 넓치 식세포에 대한 CL 반응 및 식세포 수의 변화에는 영향을 주지 않았으나, cPC-PLC에서는 현저한 억제 효과를 나타내었다. 또한, mPC-PLC는 어류 주화세포에 대한 숙주-기생충 부착시 아무런 영향을 주지 않으나, cPC-PLC는 부착율이 약간 증가되었다. 이 결과들을 미루어 스쿠티카충 mPC-PLC는 주로 기생충의 생체내 생리기능에 관여하고, cPC-PLC는 숙주세포에 침투시 중요한 인자로서 작용할 것으로 추정되었다.

제 3장에서는 숙주인 넓치에 감염된 스쿠티카충의 생존 및 방어에 관여하는 cathepsin cysteine protease의 크로닝, 생화학적 특성 및 그 기능을 조사하였다. 분자

생물학적 방법을 통하여 스쿠티카충으로부터 클로닝 된 cathepsin B 유전자는 preproenzyme으로 구성되어진 350개의 아미노산으로 17개의 putative signal peptide와 68개의 propeptide, 265개의 mature enzyme으로 구성되어져 있고, 일차 구조분석을 통해서 cathepsin B 유전자의 특징인 'GNFD' motif를 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한, 클로닝 된 cathepsin L 유전자는 preproenzyme으로 구성되어진 333개의 아미노산으로 25개의 putative signal peptide와 93개의 propeptide 및 215개의 mature enzyme으로 구성되어져 있고, 유전자의 일차구조를 통해서 cathepsin L 유전자의 특징인 'ERFNIN' 'NSW' motif를 가지고 있음을 알 수 있었다. 배양된 스쿠티카충의 추출물로부터 클로닝된 cathepsin B cysteine protease를 분리하기 위해 이온 칼럼을 통하여 분리시 30번대 분획물에서 cathepsin B 활성을 지닌 물질을 얻을 수 있었다. 이것을 SDS-PAGE, western blotting 및 gelatine-acrylamide copolymerized gel로 그 크기를 측정하였을시에 29 kDa로 나타났으며, cathepsin B specific peptide 기질인 N-carbobenzyloxy-arginyl-arginyl-7-amino-4-methylcoumarin (ZRR-MCA)를 이용하여 활성을 측정시에 강한 효소 활성을 나타내었다. 더불어, 이 효소는 어류 주화세포에 대하여 약간의 cytotoxicity가 나타났으며, 넙치로부터 얻은 혈구에 대하여서도 약간의 hemolysis 활성을 나타내었다. 이 결과들을 종합하여 보면, 스쿠티카충의 cathepsin B cysteine protease는 감염된 넙치 내에서 생존시 면역 회피나 feeding 등에 관여할 것으로 추정되었다.

본 논문을 요약하면 스쿠티카충의 숙주감염 및 방어시에 다양한 인자가 관여하리라 보아지며, 이 중 PC-PLD는 외부환경변화에 따른 기생충의 적응에 관여하며, PC-PLC는 숙주침투 및 감염시에 중요한 인자로 작용하나, cathepsin cysteine protease는 숙주인 넙치에 침투 후 생존시에 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다.

감 사 의 글

어느 덧 십년이라는 세월이 흘렀습니다. 이렇게 조그만 하나의 산물을 만들어 이루어 내었습니다. 길고도 짧은 세월동안 모자란 제자를 묵묵히 가르치고 이끌어 주신 정준기 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 많이 부족한 유전자 부분에 대하여 연구 및 실험관점등에 대하여 많은 지도를 해주신 생물공학과 이형호 교수님과, 학위논문을 수행하는 몇 년 동안 많은 지도를 해주신 김기홍 교수님께 매우 감사드립니다. 많이 부족한 논문을 수정해주시고 토의 해주신 정현도 교수님과 수산과학원 김진우 병리연구팀장님께 매우 감사드립니다. 기나긴 대학 생활동안 많은 관심과 격려를 해주신 박수일 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님께 감사드립니다. 또한 틈틈히 논문에 대하여 이야기 해주신 생물공학과 박남규 교수님 및 김중균 교수님께 감사드립니다. 실험실 선배로 많은 조언을 해주신 최동립 연구사님께 감사드립니다.

약리학 실험실에 처음 들어와서 실험에 대하여 많은 것을 가르쳐 준 은희 선배에게 고마우며, 힘들 때 고생한 현석선배에게 감사드립니다. 몇년 동안 좁은(?) 실험실에서 함께 생활하고 고생한 너무나도 기대도 많고 기대기도 한 후배, 아직도 많이 가야할 후배 상환이에게 고마움을 전하고 싶으며, 열심히 하기를 기원합니다. 아직 대학원 생활이 많이 남은 미경, 창호, 성일, 나영, 엄, 효진에게도 열심히 하기를 바랍니다. 대학생활 동안 많은 즐거움 및 조언 등을 해준 덕찬 선배, 무근 선배, 병렬 선배, 성길이형 및 많은 선배님들께 감사드립니다. 대학원 생활을 함께 동고동락한 동기 형길, 석우, 승호, 수미에게 감사하며, 멀리 가 있는 근의, 승철, 진희, 명,맹희에게도 고마움을 전합니다. 몇년 동안 실험에 대한 조언과 가르침을 준 김무상 박사님과 서정길 박사님께 감사드리며, 미국생활에서 큰 성취를 얻기를 바랍니다. 학부생 때 많은 가르침을 주신 김찬희 박사님과 은정이에게 고마움을 전하며, 좋은 결실을 맺기를 기원하고, 실험하는 동안 많은 도움을 주신 인혜누나, 혜진누나에게 감사의 말을 전하고 싶습니다. 본 학위논문을 수행하면서 많은 토의와 경험을 함께 나누며 즐거웠던 상중, 상욱 두 후배에게 매우 고마움을 전하고 싶으며, 하고자 하는 학문의 성취를 이루기를 바랍니다. 끝으로, 십수년 동안 아들을 바라보신 부모님과 누나 부부, 형 부부 및 조카 승현, 서현, 태어날 조카에게 이 논문을 받칩니다.

참고문헌

- Albi, E., and Magni, M.V. 1999. Phosphatidylcholine-dependent phospholipase C in rat liver chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 640-643.
- Amtmann, E. 1996. The antiviral, antitumoural xanthate D609 is a competitive inhibitor of phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 22, 287-294.
- Alves, C.R., Corte-Real, S., Rosa, M. D-F., and Giovanni-De-Simone, S. 2000. Detection of cysteine-proteases in *Leishmania amazonensis* promastigotes using a cross-reactive antiserum. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 263-267.
- Ardelli, B.F., Witt, J.D.S., and Woo, P.T.K. 2000. Identification of glycosomes and metabolic end products in pathogenic and nonpathogenic strains of *Cryptobia salmositica* (Kinetoplastida: Bodonidae). *Dis. Aquatic. Org.* 42, 41-51.
- Balaji, K.J., and Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., and Henkart, P.A. 2002. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Experi. Med.* 196, 493-503.
- Banno, Y., Yano, K., and Nozawa, Y. 1983. Purification and characterization of a secreted protease from *Tetrahymena pyriformis*, *Eur. J. Biochem.* 132, 563-568.
- Barret, A.J., and Kirschke, H. 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.* 80, 535-561.
- Berger, H., Johns, P., and Hanahan, D.J. 1972. Structural studies on lipids of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 617-629.
- Besterman, J.M., Duronio, V., and Cuatrecasas, P. 1985. Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 6785-6789.
- Bisaggio, D.F.R., and Peres-Sampaio, C.E. 2003. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol. Res.* 91, 273-282.
- Blum, J.J., Lehman, J.A., Horn, J.M., and Gomez-Cambronero, J. 2001. Phospholipase D is present in *Leishmania donovani* and its activity increases in response to acute osmotic stress. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 102-110.
- Bordmann G., Rudin, W., and Favre, N. 1998. Immunization of mice with phosphatidylcholine drastically reduced the parasitaemia of subsequent *Plamodium cabaudi chabaudi* blood-stage infections. *Immunol.* 94, 35-40.
- Caffrey, R.C., Salter, J.P., Lucas, K.D., Khiem, D., Hsieh, I., Lim, K.C., Ruppel, A., Mckerrow, J.H., and Sajid., M. 2002. SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 49-61.
- Catalfamo, M., and Henkart, P.A. 2003. Perforin and the granule exocytosis

- cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 522-527.
- Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C., and Hellman, U. 1989. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 33-42.
- Chung, J.K., Sekiya, F., Kang, H.S., Lee, C.H., Han, J.S., Kim, S.R., Bae, Y.S., Morris, A.J., and Rhee, S.G. 1997. Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 272, 15980-15985.
- Cockcroft, S., Thomas, G.M.H., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N.F., Trung, O., and Hsuan, I.J. 1994. Phospholipase D: A downstream effector of ARF in granulocytes. *Science.* 263, 523-526.
- Colley, W.C., Sung, T.C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshuler, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A.J., and Frohman, M.A. 1997. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol.* 7, 191-201.
- Connelly, M.C., and Kierszenbaum, F. 1984. Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 121, 931-939.
- Connelly, M.C., and Kierszenbaum, F. 1985. Increased host cell-*Trypanosoma cruzi* interaction following phospholipase D treatment of the parasite surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 191-202.
- Coombs, G.H., and North, M.J. 1991. *Biochemical protozoology*, Tayer and Francis, London, Washington DC.
- Cribb, A.E., Despres, R.J., and Cawthorn, T. 1999. Tetrazolium-based cytotoxicity assay to determine anti-protozoal activity against the scuticociliate *Anohryoides haemopholia*. *Dis. Aquat. Org.* 35, 213-219.
- Crosbie, P.B., and Munday, B.L. 1999. Environmental factors and chemical agents affecting the growth of the pathogenic marine ciliate *Uronema nigricans*. *Dis. Aquat. Organ.* 36, 213-219.
- De Carvalho, H., Yan, C.Y., and De Souza, W. 1993. Effect of various digestive enzymes on the interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. *Parasitol. Res.* 79, 114-118.
- Delong, E.F., and Yayanos, A.A. 1985. Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science.* 228, 1101-1103.
- Ellis, M., Sharma, D.K., Hilley, J.D., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. 2002. Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. *J. Biol. Chem.* 277, 27968-27974.
- Erwin, J.A., and Bloch, K. 1963. Lipid metabolism of ciliated protozoa. *J. Biol. Chem.* 238, 1618-1624.
- Exton, J.H. 1997. New development in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 272, 15579-15582.

- Exton, J.H. 2002. Phospholipase D-Structure, regulation and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 144, 1-94.
- Feng, S., and Woo, P.T.K. 1998. Identification of carbohydrates on the surface membrane of pathogenic and nonpathogenic piscine haemoflagellates, *Cryptobia salmositica*, *C. bullocki* and *C. catostomi* (Kinetoplastida). *Dis. Aquat. Org.* 32, 201-209.
- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J., and Ramussen, L. 1985. Cytolytic activity released from *Tetrahymena*. *J. Protozool.* 32, 657-660.
- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J., and Ramussen, L. 1986. Phospholipases and phosphonolipids in a ciliate: an attack and defence system. *TIBS.* 11, 354-355.
- Florin-Christensen, J., Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., McElwain, T.F., and Palmer, G.H. 2000. Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106, 147-156.
- Furuhashi, K. 2002. Identification and characterization of a cathepsin B-like protease in *Physarum sclerotium*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1308-1316.
- Golgher, D.B., Colli, W., Souto-Padron, T., and Zingales, B. 1993. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 60(2):249-64.
- Grogl, M., and Franke, E.D., McGreevy, P.B., and Kuhn, R.E. 1987. *Leshmania braziliensis* protein, carbohydrates and antigen differences between log phase and stationary phase promastigotes *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 83, 352-359.
- Grewirtz, A.T., and Simons, E.R. 1997. Phospholipase D mediates Fc gamma receptor activation of neutrophils and provides specificity between high-valency immune complexes and fMLP signaling pathways. *J. Leukec. Biol.* 61, 522-528.
- Grothe, K., Hanke, C., Momayezi, M., Kissmehl, R., Plattner, H., and Schultz, J.E. Functional characterization and localization of protein phosphatase type 2C from *Paramecium*. *J. Biol. Chem.* 273, 19167-19172.
- Guan, Z., Grunler, J., Piao, S., and Sindelar, P.J. 2001. Separation and quantitation of phospholipids and their ether analogues by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 297, 137-143.
- Han, J.S., Hyun, B.C., Kim, J.H., and Shin, I. 1999. Fas mediated activation of phospholipase D is coupled to the stimulation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in A20 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 233239.
- Harnett, W., and Harnett, M.M. 2001. Modulation of the host immune by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes. *Biochimica. Biophysica. Acta.* 159, 7-15.
- Heise, N., Raper, J., Buxbaum, L. U., Peranovich, T.M.S., and Cardoso de Almeida, M.L. 1996. Identification of complete precursors for the

- glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 271, 16877-16887.
- Iglesias, R., Parama, A., Alvarez, M.F., Leiro J., and Sanmartin, M.L. 2002. Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. Dis. Aquatic. Org. 49, 191-197.
- Iglesias, R., Parama, A., Alvarez, M.F., Leiro J., Ubeira, F.M. and Sanmartin, M.L. 2003. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. Parasitol. 126, 125-134.
- Jee, B.Y., Kim, Y.C., and Park, M.S. 2001. Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis. Aquat. Org. 47, 49-55.
- Jepson, M., and Titball, R. 2000. Structure and function of *clostridial* phospholipase C. Microbes Infection, 2, 1277-1284.
- Jonaha, M. and Erwin, J.A. 1971. The lipids of membraneous cell organelles isolated from the ciliate, *Tetrahymena pyriformis*. Biochim. Biophys. Acta. 231, 80-92.
- Karrer, K.M., Peiffer, S.L., and Ditomas, M.E. 1993. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 3063-3067.
- Kang, M.S., Oh, M.J., Kim, Y.J., Kawai, K., and Jung, S.J. 2003. Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). J. Fish Dis. 26, 657-665.
- Kates M. and Volcani, B.E. 1966. Lipid components of diatoms. Biochim. Biophys. Acta. 4, 116, 264-278.
- Keene, E.W., Petit, G.M., Allen, S., and Mckerrow, H.J. 1986. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. 163, 536-549.
- Kennedy, K.E., and Thompson, G.A. 1970. Phosphonolipids: Localization in surface membranes of *Tetrahymena*. Science. 168, 989-991.
- Kelley, G.O., Adkison, M.A., Leutenegger, C.M., and Hedrick, R.P. 2003. *Myxobolus cerebralis*: identification of a cathepsin Z-like protease gene (MyxCP-1) expressed during parasite development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Experi. Parasitol. 105, 201-210.
- Kim, J.H., Ogawa, K., Wakabayashi, H. 1999. Lectin-reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis*, Dis. Aquat. Org. 39, 59-63.
- Knauss, T.C., Jaffer, F.E., Abboud, H.E. 1990. Phosphatic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. Role of protein kinase C. J. Biol. Chem. 265, 14457-14463.

- Kovacs, P., Csaba, G., Ito, Y., and Nozawa, Y. 1996. Effect of insulin on the phospholipase-D activity of untreated and insulin-pretreated (Hormonally imprinted) *Tetrahymena*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 222, 359-361.
- Kovacs, P., Csaba, G., Nakashima, S., and Nozawa, Y. 1997. Phospholipase D activity in the *Tetrahymena pyriformis* GL. *Cell Biochem. Fun.* 15, 53-60.
- Kurz, T., Kemken, D., Mier, K., Weber, I., and Richardt, G. 2004. Human cardiac phospholipase D activity is tightly controlled by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36, 225-232.
- Kusner, D.J., Hall, C.F., and Schlesinger, L.S. 1996. Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. *J. Exp. Med.* 184, 585-595.
- Kwak, J.Y., Lopea, I., Uhlinger, D.J., Ryu, S.H., and Lambeth, J.D. 1995. RhoA and a cytosolic 50-kDa factor reconstitute GTP γ S-dependent phospholipase D activity in human neutrophil subcellular fractions. *J. Biol. Chem.* 270, 27093-27098.
- Kwon, S.R., Kim, C.S., Ahn, K.J., Cho, J.B., Chung, J.K., Lee, H.H., and Kim, K.H. 2002. Protease in cell lysate of *Uronema marinum* (Ciliata: Scuticociliatida), an opportunistic pathogen of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Fish. Sci. Tech.* 5, 145-149.
- Kwon, S.R., Kim, C.S., and Kim, K.H. 2003. Differences between short- and long-term cultures of *Uronema marinum* (Ciliophora: Scuticociliatida) in chemiluminescence inhibitory activity, antioxidative enzyme and protease activity. *Aqua.* 221, 107-114.
- Kwon, S.R., Chung, J.K., Lee, H.H., and Kim, K.H. 2002. Effects of oxytetracycline treatments on the infection potential of scuticociliates in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish. Sci. Tech.* 5, 1-4.
- Lammler, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lee, E.H., Kim, C.S., Cho, J.B., Ahn, K.J., and Kim, K.H. 2003. Measurement of protease activity of olive *Uronema marinum* (Ciliata: Scuticociliatida) by fluorescence polarization. *Dis. Aquat. Org.* 54, 85-88.
- Lecaille, F., Kaleta, J., and Bromme, D. 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases; Their role in physiology and pathology and recent development in inhibitor design. *Chem. Rev.* 102, 4459-4488.
- Lenanartz, M.R. 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 415-430.
- Lin, P.Y., Wiggan, G.A., Gilfillan, A.M. 1991. Gilfillan, Activation of phospholipase D in a rat mast (RBL 2H3) cell line. A possible unifying mechanism for IgE-dependent degradation and arachidonic acid metabolite release. *J. Immunol.* 146, 1609-1616.

- Lipps, G., Füllkrug, R., and Beck, E. 1996. Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*: purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 271, 17171-1725.
- Malcolm, K.C., Ross, A.H., Qiu R., Sumons M., and Exton, J.H. 1994. Activation of rat liver phospholipase D by the small GTP-binding protein RhoA. J. Biol. Chem. 269, 25951-25954.
- Maruyama, H., Banno, Y., Watanabe, T., and Nozawa, Y. 1982. Studies on thermal adaptation in *Tetrahymena* membrane lipids. modification of positional distribution of phospholipid acyl chains in plasma membranes, mitochondria and microsomes. Biochim. Biophys. Acta. 711, 229-244.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. Trends in cell Biol. 8, 410-415.
- Mckerrow, J.H., 1989. Parasite proteinases. Exp. Parasitol. 68, 111-115.
- Mckerrow, J.H. 1999. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy of parasitic disease: insights on safety, target validation, and mechanism of action. Int. J. Parasitol. 1999. 29, 833-837.
- Mirhaghani, A., and Warton, A. 1998. Involvement of *Trichomonas vaginalis* surfaces-associated glycoconjugates in the parasite/target cell interaction. A quantitative electron microscopy study. Parasitol. Res. 84, 374-381.
- Morrison, W.R., and Smith, L.M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid Res. 5, 600-608.
- Morrtan, J.C., Helm, M.J., Coombs, G.H., and Sajid, M. 2003. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. Trends Parasitol. 19, 182-187.
- Nakamura, S., Shimooku, K., Akisue, T., Jinnai, H., Hitomi, T., Kiyohara, Y., Ogino, C., Yoshida, K., and Nishizuka, Y. 1995. Mammalian phospholipase D: Activation by ammonium sulfate and nucleotides. Proc. Natl. Sci. USA. 92, 12319-12322.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. Protein Engineering. 10, 1-6.
- North, M.J., and Walker, M. 1984. An analysis of intracellular proteolytic activities of *Tetrahymena pyriformis* GL. J. Gen. Microbiol. 130, 1977-1985.
- North, M.J., Mottram, J.C., Coombs, G.H. 1990. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. Parasitol. Today. 6, 270-274.
- Ohguchi, K., Banno, Y., Nakshima, S., and Nozawa, Y. 1996. Regulation of membrane-bound phospholipase D by protein kinase C in HL 60 cells. J. Biol. Chem. 271, 4366-4372.
- Okamura, S., and Yamashita, S. 1994. Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from Pig lung. J. Biol. Chem. 269, 31207-31213.

- Olson, S.C., and Lambeth, J.D. 1996. Biochemistry and cell biology of phospholipase D in human neutrophils. 80, 3-19.
- Paquette, C.A., Rakochy, V., Bush, A., and Houten, J.L. 2001. Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in *Paramecium tetraurelia*: Possible role in chemoresponse. J. Experi. Biol. 204, 2899-2910.
- Parrish, C.C., DeFreitas, A.S.W., Bodennec, G., Macpherson, E.J., and Ackman, R.G. 1991. Lipid composition of the toxic marine diatom, *Nitzschia pungens*. Phytochemistry. 30, 113-116.
- Patton, J.S. 1975. The effect of pressure and temperature on phospholipid and triglyceride fatty acids of fish white muscle: a comparison of deepwater and surface marine species. Comp. Biochem. Physiol. 52B, 105-110.
- Pomerantsev, A.P., Kalnin, K.V., Osorio, M., and Leppla, S.H. 2003. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* groups. Infect. Immun. 71, 6591-6606.
- Preuss, I., Kaiser, I., and Gehring, U. 2001. Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. Eur. J. Biochem. 268, 5081-5091.
- Price, B.D., Morris, J.D., Marshall, C.J., and Hall, A. 1989. Stimulation of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol release, and arachidonic acid production by oncogenic ras is a consequence of protein kinase C activation. J. Biol. Chem. 264, 16638-16643.
- Rasmussen, M., and Rasmussen, L. 1999. Phospholipase D in *Tetrahymena*: activity and significance. Comp. Biochem. Physiol. 124B, 467-473.
- Rebecchi, M.J., and Pentylala, S.N. 2000. Structure, function and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. Physiol. Rev. 80, 1291-1335.
- Ricard, J., Pelloux, H., Gross, U., Meunier, A., and Ambroise-Thomas, P. 1999. Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor. J. Parasitol. 85, 583-585.
- Ricard J, Pelloux H, Favier AL, Gross U, Brambilla E, Ambroise-Thomas P. 1999. *Toxoplasma gondii*: role of the phosphatidylcholine-specific phospholipase C during cell invasion and intracellular development. Exp Parasitol. 91, 231-237.
- Riberiro, S., de Araujo Soares, R.M., Sales Alviano, C., Da Silva, E.F., De souza, W., and Angluster, J. 1997. Cell-surface carbohydrates of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 83, 801-805.
- Rhoads, D.E and Kaneshiro, E.S. 1979. Characterizations of phospholipids from *Paramecium tetraurelia* cells and cilia. J. Protozoo., 26, 329-338.
- Robertson, C.D., and Coombs, G.H. 1993. Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. Mol. Biochem. Parasitol. 62, 271-280.
- Robertson, C.D., Martines, J., Cazzulo, J.J., and Coombs, G.H. 1994. Analysis of the cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi* using

- specific antisera. FEMS Microbiol. Lett. 124, 191-194.
- Rosenthal, P.J., and Nelson, R.G. 1992. Isolation and characterization of a cysteine proteinase gene of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 51, 143-152.
- Rosoff, P.M., Savage, N., and Dinarello, C.A. 1988. Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. Cell. 54, 7381.
- Saffer, L.D., and Schwartzman, V. 1991. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. J. Protozol. 38, 454-460.
- Sajid, M., and Mckerrow, J.H. 2002. Cysteine protease of parasitic organisms. Mol. Biochem. Parasitol. 120, 1-21.
- Sands, W.A., Clark, J.S., Liew, F.Y. 1994. The role of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C in the production of diacylglycerol for nitric oxide synthesis in macrophage activated by IFN-gamma and LPS. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199, 461-466.
- Sauer, G., Amtmann, E., Melber, K., Knapp, A., Muller, K., Hummel, K., and Scherm, A. 1984. DNA and RNA virus species are inhibited by xanthates, a class of antiviral compounds with unique properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 3263-3267.
- Scott, A.L., and Klesius, P.H. 1981. Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. Dev. Biol. Stand. 49, 243-254.
- Sco, J.S., Kim, K.H., Lee, H.H., and Chung, J.K. 2003. Membrane lipids of a marine ciliate protozoan (*Uronema marinum*). J. Fish. Sci. Tech. 6, 155-159.
- Shin, I.C., and Han, J.S. 2000. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C-mediated induction of phospholipase D activity in Fas-expressing murine cells. Comp. Biochem. Physiol. 126 (B), 445-453.
- Spinella, S., Levavasseur, E., Petek, F., and Rigotherier, M.C. 1999. Purification and biochemical characterization of a novel cysteine protease of *Entamoeba histolytica*. Eur. J. Biochem. 266, 170-180.
- Siddiqi, A.R., Smith, J.L., Ross, A.H., Qiu, R., Symons, M., and Exton, J.H. 1995. Regulation of phospholipase D in HL60 cells. J. Biol. Chem. 270, 8466-8473.
- Suzuki, K.M., Hayahi, N., Hosoya, N., Takahashi, T., Kosaka, T., and Hosoya, H. 1998. Secretion of tetraim, a *Tetrahymena* cysteine protease, as a mature enzyme and its identification as a member of the cathepsin L subfamily. Eur. J. Biochem. 254, 6-13.
- Sul, D. and Erwin, J.A. 1997. The membrane lipids of the marine ciliated protozoan *Parauronema acutum*. Biochim. Biophys. Acta. 1345, 162-171.
- Tiball, R.W. 1993. Bacterial phospholipase C. Microbiol. Rev. 57, 347-366.
- Tiball, R.W., Hunter, S.E.C., Martin, K.L., Morris, B.C., Shuttleworth, A.D., Rubridge, T., Anderson, D.W., and Kelly, D.C. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alphatoxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. Infect. Immun. 57, 367-376.

- Thompson, C.L. Jr., and Moewus, L. 1964. *Miamiensis avidus* n.g.s., a marine facultative parasite in the ciliate order Hymenostomatida. J. Protozol. 11, 378-381.
- Towbin, H., and Gordon, J. 1984. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. J. Immunol. Methods. 72, 313.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. 2000. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. Biochim. Biophys. Acta. 1477, 98-111.
- Vial, H.J., Eldin, P., Tielens, A.G.M., van Hellemond, J.J. 2003. Phospholipids in parasite protozoa. Mol. Biochem. Parasitol. 126, 143-154.
- Vinggaard, A.M., and Hansen, H.S. 1995. Characterization and partial purification of phospholipase D from human placenta. Biochimica et Biophysica. Acta. 1258, 169-176.
- Volkel, H., Kurz, U., Linder, J., Klumpp, S., Gnau, V., Jung, G., and Schultz, J.E. 1996. Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*. Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide. Eur. J. Biochem. 238, 198-206.
- Wakelam, M.J. 1998. Diacylglycerol-when is it an intracellular messenger? Biochim. Biophys. Acta. 1436, 117-126.
- Wang, S., Banno, Y., Nakashima, S., and Nozawa, Y. 2001. 48, Enzymatic characterization of phospholipase D of protozoan *Tetrahymena* cells. J. Eukaryot. Microbiol. 48, 194-201.
- Watanabe T., Fukushima H., Kasai, R., and Nozawa, Y. 1981. Studies on thermal adaptation in *Tetrahymena* membrane lipids: Changes in positional distribution of fatty acids in diacyl-phospholipids and alkyl-acyl-phospholipids during temperature acclimation. Biochim. Biophys. Acta. 665, 66-73.
- Wilkowsky, S.E., Barbieri, M.A., Stahl, P.D., and Isola, E.L.D. 2002. Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases Dynamin, Rab5, and Rab7. Biochem. Biophys. Res. Comm. 291, 516-521.
- Xu, D.H., Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A. 2001. Effect of lectins on the invasion of *Ichthyophthirius theront* to channel catfish tissue. Dis. Aquatic. Org. 45, 115-120.
- Yun, H.C., Kim, K.Y., Park, S.Y., Park, S.K., Park, H., Hwang, U.K., Hong, K.M., Ryu, J.S., and Min, D.Y. 1999. Cloning of a cysteine proteinase gene from *Acanthamoeba culbertsoni*. Mol. Cells. 9, 491-496.
- Zidovetzki, R. and Sherman, I.W. 1991. Lipid composition of the membranes of malaria-infected erythrocytes and the role of drug-lipid interactions in the mechanism of action of chloroquine and other antimalarials. In: Coombs G, North M, editors. Biochemical Protozoology. Taylor and Francis, London, pp. 8-99.
- Zuo, X., and Woo, P.T.K. 1997. Proteases in pathogenic and nonpathogenic

haemoflagellates, *Cryptobia* spp. (Sarcomastigophora: Kinetoplastida), of fishes. Dis. Aquatic. Org. 29, 57-65.

Zuo, X., and Woo, P.T.K. 1998. *In vitro* secretion of metallo-protease (200 kDa) by the pathogenic piscine haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* Kata, and stimulation of protease production by collagen. J. Fish. Dis. 21, 249-255.